

QL
951
J57

Journal of Embryology and Experimental Morphology

VOLUME 3

March 1955

PART 1

PUBLISHED FOR THE COMPANY OF BIOLOGISTS LIMITED

OXFORD : AT THE CLARENDON PRESS

EDITORIAL BOARD

M. ABERCROMBIE (London)	SIDNIE M. MANTON (London)
G. R. DE BEER (London)	P. B. MEDAWAR (London)
J. D. BOYD (Cambridge)	D. R. NEWTH (London)
J. BRACHET (Brussels)	J. PASTEELS (Brussels)
F. W. R. BRAMBELL (Bangor)	CHR. P. RAVEN (Utrecht)
A. M. DALCQ (Brussels)	A. STEFANELLI (Rome)
E. FAURÉ-FREMIET (Paris)	S. TOIVONEN (Helsinki)
HONOR B. FELL (Cambridge)	C. H. WADDINGTON (Edinburgh)
W. J. HAMILTON (London)	M. W. WOERDEMAN (Amsterdam)
J. HOLTFRETER (Rochester, N.Y.)	ET. C. WOLFF (Strasbourg)
S. HÖRSTADIUS (Uppsala)	J. Z. YOUNG (London)
F. E. LEHMANN (Bern)	S. ZUCKERMAN (Birmingham)

Editor: M. ABERCROMBIE

INFORMATION ABOUT THE JOURNAL

The main object of the Journal is to bring together work concerned with all the kinds of developmental process to be found in animals at any stage of their life-history. It will include work on embryology (descriptive, experimental, chemical, physiological), on regeneration and healing, on the developmental changes involved in functional adaptation, on growth, ageing, and other aspects of late morphogenesis. It will publish studies of gametes and gametogenesis where the work is not primarily of cytological interest; and studies of developmental genetics and of the physiology of reproduction where these fall more within its scope than within the usual scope of existing specialized journals. Papers on those aspects of protozoology which have a bearing on morphogenesis will be acceptable. Papers concerned with developmental processes in plants may be included if they connect with zoological aspects of morphogenesis.

The papers published will for the most part be accounts of finished pieces of research. Preliminary reports will not be published. Theses and very long papers are unlikely to be accepted at present. Theoretical and review papers may be published from time to time, as space allows. Contributions may be in English, French, or German. Contributors wishing to use other languages should consult the Editor.

Journal of Embryology and Experimental Morphology is published quarterly. Subscription price £4. 4s. 0d. yearly for the four numbers; for this sum (*prepaid*) the Journal is sent Post Free to any part of the world. Separate numbers price 25s. Correspondence, except that about the subject-matter of the Journal which should be sent to the Editor, should be addressed to the Publisher:

GEOFFREY CUMBERLEGE

OXFORD UNIVERSITY PRESS, AMEN HOUSE, LONDON, E.C. 4

1127K

Malformations des membres dues à des lésions vasculaires chez le fœtus de rat déficient en acide pantothéique

par A. GIROUD, J. LEFEBVRES, H. PROST, et R. DUPUIS¹

*Laboratoire d'Embryologie de la Faculté de Médecine de Paris, et
Laboratoire de Physiologie de la Nutrition de l'École des Hautes Études*

AVEC TROIS PLANCHES

INTRODUCTION

UNE déficience maternelle en acide pantothéique entraîne chez l'embryon une série de malformations, comme l'a montré l'un de nous (Lefèvres, 1951): ce sont des exencéphalias ou des pseudencéphalias, des anophthalmies ou des microptalmies; de plus, on rencontre des œdèmes et des lésions vasculaires localisées. Ce sont ces dernières que nous voulons étudier spécialement ici.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Pour réaliser ces carences, nous avons soumis des rates adultes à un régime synthétique à base de: saccharose (68 pour cent), caséine (18 pour cent), huile d'arachide (10 pour cent), sels (4 pour cent), supplémenté par des vitamines hydrosolubles (cristallisées), mais sans acide pantothéique, et des vitamines liposolubles (en solutions huileuses) en quantités adéquates. Plus le temps de ce régime est long, plus la carence réalisée sera intense. Les rates sont surveillées au point de vue du cycle génital par la technique des frottis vaginaux; elles sont accouplées au moment de l'œstrus avec des mâles normalement nourris (régime d'élevage). Des témoins recevant le même régime complété par une dose suffisante d'acide pantothéique sont traitées de la même façon et donnent des portées normales, quelle que soit la durée de l'expérience.

Chez les carencées, les résultats varient selon le degré de carence: ils vont de l'avortement à l'obtention de portées normales, en passant par des portées avec fœtus anormaux.

Tous les stades de la gestation ont été explorés, depuis le 13^e jour jusqu'au 21^e. Nous n'avons jamais observé les lésions vasculaires des extrémités avant le 16^e jour. Les membres des fœtus atteints de ces lésions ont été coupés et étudiés en série continue.

¹ Authors' address: Laboratoire d'Embryologie, Faculté de Médecine de Paris, 45 rue des Sts Pères, Paris VI^e, France.

ÉTUDE DES LÉSIONS VASCULAIRES ET DE LEURS RÉPERCUSSIONS

Ces accidents vasculaires sont bien caractéristiques quant à leur aspect et à leur localisation et peuvent entraîner d'importantes altérations squelettiques.

On les rencontre assez fréquemment. Nous en avons observé 22,7 pour cent dans une série de recherches qui avaient porté sur 224 fœtus de mères déficientes en acide pantothénique.

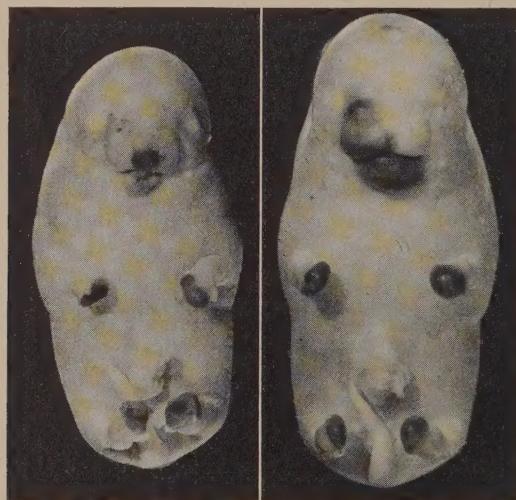


FIG. 1. Photographies de deux fœtus du 19^e jour atteints d'altérations des pattes.

Ces lésions sont localisées essentiellement aux extrémités des pattes, surtout des pattes postérieures: elles se limitent au pied ou à la main, et surtout à leur partie terminale (Fig. 1 et 2 dans le texte). On peut en retrouver cependant au niveau de la mâchoire inférieure. Quelquefois, on observe ailleurs des lésions hémorragiques diffuses qui n'ont peut-être pas la même signification.

Chez le fœtus du 21^e jour, ces lésions apparaissent très bien limitées. Elles forment généralement des saillies arrondies plus ou moins volumineuses, fréquemment d'aspect mamelonné. Elles peuvent, en effet, être constituées soit par une saillie simple, soit, plus souvent, par des saillies confluentes par leur base. Leur taille est variable. Leur coloration est d'un rouge plus ou moins marqué; elles sont souvent rouge sombre, mais on peut en rencontrer de roses plus ou moins pâles. Elles sont surtout limitées au bord distal de la main ou du pied. Quelquefois, elles peuvent se limiter à un doigt. Le plus généralement, elles s'étendent à tout l'organe et transforment ainsi toute l'extrémité du membre en

une plaque enflée et rougeâtre où les doigts ne se reconnaissent pas. Au 18^e jour, les aspects sont déjà analogues (Fig. 3 dans le texte).

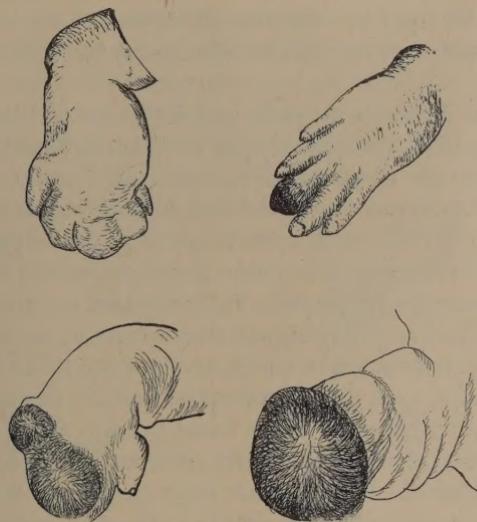


FIG. 2. Dessins de quelques pattes atteintes de lésions d'aspect divers. Fœtus du 19^e et du 21^e jour.

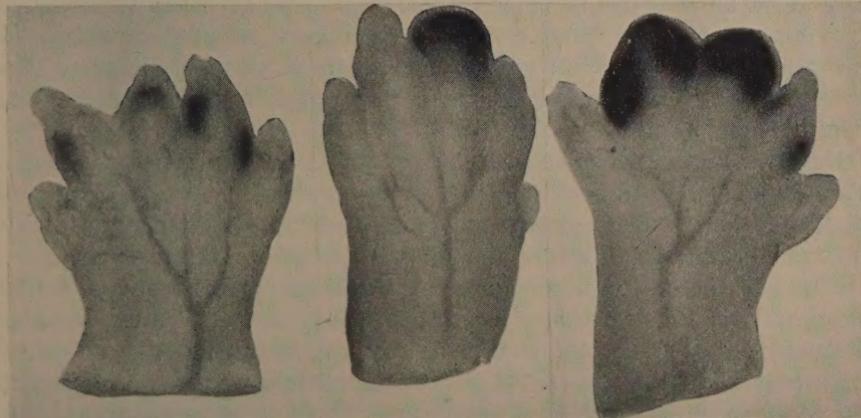


FIG. 3. Photographies de pattes peu altérées chez des fœtus du 18^e jour.

Sur des fœtus du 16^e jour, par contre, où l'extrémité des membres est encore en forme de palette, les aspects sont parfois différents. Les lésions sont moins marquées, elles sont plus nettement individualisées et situées entre les rayons squelettiques. On peut les apercevoir par transparence.

L'étude histologique est assez instructive, en particulier sur les coupes parallèles au plan d'étalement de la main ou du pied.

Chez les fœtus du 21^e jour, ces lésions sont caractéristiques. Elles paraissent constituées avant tout par un amas massif de sang à contours arrondis, très souvent polycyclique, comme s'il correspondait à la confluence de plusieurs lésions.

A ce niveau, les éléments du sang, qui sont essentiellement des éléments nucléés, ne sont pas tous dans le même état. Certains érythroblastes se présentent avec leur noyau sous leur aspect habituel, tandis que d'autres, au contraire, sont nettement altérés. Certains ont un aspect franchement vésiculaire. Chez d'autres, la membrane cellulaire elle-même disparaît, et on ne trouve plus que leur noyau isolé. D'autres érythroblastes, au contraire, apparaissent très condensés, avec un protoplasme très fortement acidophile. Fréquemment, ces altérations sanguines sont disposées en couches concentriques, déterminant un aspect en cocarde. Du pigment ocre apparaît de temps en temps, révélant que les altérations sanguines peuvent être très poussées et que ces lésions ne sont pas très récentes.

Généralement, l'amas sanguin paraît limité par une coque constituée par un tissu mésenchymateux dense. Cette paroi nettement délimitée en profondeur l'est encore plus en surface. Là, elle forme une couche de trois ou quatre cellules d'épaisseur, séparant ainsi complètement la lésion de l'épiderme. Elle est constituée de cellules mésenchymateuses juxtaposées, sans substance intercellulaire.

Au contact de ces amas sanguins, on rencontre des vaisseaux dilatés correspondant aux veines marginales du membre. Leurs rapports avec ces vaisseaux ne sont pas toujours faciles à préciser à ce stade: cependant, par l'étude sérieée des coupes, on peut se rendre compte que certains viennent s'ouvrir dans les cavités hématiques. Quelques images révèlent que les amas sanguins sont contenus dans des vaisseaux irrégulièrement dilatés, car ils sont limités par des éléments endothéliaux.

Dans les formations hématiques d'assez grandes dimensions, on constate d'autre part une infiltration des parois par des érythroblastes. Celle-ci est constituée de cellules sanguines réparties d'une façon diffuse dans les mailles du tissu entourant l'hémorragie. Cette infiltration paraît de production secondaire.

Chez les fœtus du 18^e jour, on rencontre des lésions assez analogues. A côté des cavités hémorragiques pures, on en observe assez souvent d'autres à contour également polycyclique, mais ne contenant d'éléments sanguins qu'en quantité relativement limitée. Dans ces cas, ces cellules sanguines ne sont pas réparties d'une façon homogène, mais localisées en un certain point et comme agglutinées. Le reste de la cavité renferme quelques débris cellulaires et un léger coagulum. Entre ces vésicules partiellement vides et les vésicules complètement hématiques, on trouve tous les types intermédiaires, mais, de plus, on constate qu'elles confluent les unes avec les autres.

Par ailleurs, et exceptionnellement, nous avons rencontré des petites vésicules directement situées sous l'épiderme. Elles paraissent vides ou ne renferment

qu'un très léger coagulum. Elles n'ont pas de parois mésenchymateuses condensées, en particulier, leur contact avec l'épiderme est direct. La nature artificielle de certaines peut être discutée, mais d'autres correspondent morphologiquement aux vésicules séreuses sous-épidermiques décrites par divers auteurs, soulevant l'épiderme d'un côté et déprimant de l'autre le mésenchyme sous-jacent. Nous n'en avons pas retrouvé sur des fœtus plus jeunes.

Nous avons pu saisir, au 16^e jour, le début des lésions. L'étude de ce stade s'est révélée assez démonstrative. Le fait primitif paraît être une énorme dilata-



FIG. 4. Dessins de pattes de fœtus du 16^e jour vues par transparence après éclaircissement. On voit la dilatation de la veine marginale et le sang qui s'y coagule.

tion des veines marginales (Fig. 4 dans le texte). Celles-ci peuvent être remplies de sang, mais quelques fois contiennent surtout du plasma. On peut observer aussi assez souvent dans ces vaisseaux des amas de cellules sanguines apparaissant comme des éléments coagulés: les thrombi (Fig. A, Planche 1).

Par ailleurs, on voit des amas sanguins directement au contact du mésenchyme, se continuant souvent avec les veines marginales. D'autre part, on peut se rendre compte que, au moins en certains points, ces amas sanguins peuvent être nettement limités par un endothélium en continuité avec l'endothélium veineux.

Primitivement, ces thrombi sont donc intravasculaires, puis, secondairement, l'endothélium veineux ayant disparu, ils viennent en contact direct avec le mésenchyme.

De plus, au voisinage des amas sanguins, il se produit des phénomènes de dégénérescence (Fig. B, Planche 1; et Fig. I, Planche 3). Les cellules mésenchymateuses se distendent et s'écartent les unes des autres, et secondairement, elles entrent en cytolysse: leur protoplasma se détruit tandis que leur noyau se pycnose pour disparaître à son tour après fragmentation. Ces plages semblent un centre d'attraction d'eau, car leur taille finit par être beaucoup plus grande que les tissus qui se sont détruits. D'abord limitées au voisinage des amas sanguins, elles deviennent de plus en plus grandes et cette dégénérescence s'étend de proche en proche. De la sorte, se créent au contact des amas sanguins de grands

espaces vides. Ces nouvelles cavités, comme les amas sanguins qui sont en continuité avec elles, restent toujours séparées de l'épiderme par une couche plus ou moins épaisse de cellules mésenchymateuses. Elles ne peuvent ainsi être confondues avec les vésicules sous-épidermiques (Fig. C, Planche 1; et Fig. F, Planche 2).

Dans ces conditions, les faits peuvent être interprétés de la sorte.

Il n'y a pas de formes de passage entre les vésicules sous-épidermiques et les lésions caractéristiques. Par contre, la continuité évolutive est complète entre les vaisseaux dilatés gorgés de sang et les amas sanguins libres par disparition de l'endothélium veineux. Secondairement, des zones de cytolysé apparaissent au contact de ces amas sanguins, créant de grandes cavités. Cette cytolysé s'étend ensuite à diverses formations et en particulier au squelette.

Ces lésions ont beaucoup de répercussions, et c'est là leur principal intérêt. Certaines de celles-ci peuvent être considérées comme légères, tandis que d'autres, au contraire, sont très importantes, car elles atteignent les pièces squelettiques terminales.

Dans certains cas, et surtout à des stades avancés, on peut observer des altérations du côté de l'épiderme: nous l'avons vu sur des fœtus du 19^e et du 21^e jour. Il se produit d'abord un amincissement de ce tissu, puis une résorption de sa partie profonde et enfin une destruction de sa partie superficielle. Les liquides ou les foyers hémorragiques peuvent ainsi s'éliminer.

Au niveau des éléments profonds, en particulier au niveau des pièces squelettiques, les répercussions sont beaucoup plus graves.

L'étude des coupes parallèles à la surface de la main ou du pied révèle, chez les fœtus du 21^e et du 18^e jour, qu'il existe des altérations ou des destructions des pièces terminales.

Dans de nombreux cas, les pièces distales du squelette des doigts, surtout des doigts médians, semblent disparues (Fig. E et F de la Planche 2). L'étude des coupes en série montre en effet qu'au delà des métacarpiens ou métatarsiens qui viennent au contact des amas sanguins, on ne trouve pas trace de pièces squelettiques.

Les métacarpiens et les métatarsiens persistent. Souvent, cependant, leur extrémité distale semble élargie et même étalée. Quelquefois, ils sont manifestement coudés comme s'ils étaient déformés par la pression des amas sanguins (Fig. G et H de la Planche 2); ils paraissent alors souvent très allongés comme s'ils étaient prolongés par des éléments non individualisés du squelette digital.

L'étude des fœtus du 16^e jour permet de comprendre ces disparitions.

Comme nous l'avons dit antérieurement, des plages de cytolysé se développent autour des amas hématiques. Or, cette cytolysé s'étend aux formations voisines et en particulier aux jeunes pièces squelettiques des doigts, qui sont encore au stade squelettogène ou de précartilage. Cette cytolysé s'attaque à elles, soit latéralement, soit surtout par leur extrémité distale. Au point où ces rayons squelettogènes viennent au contact des tissus en dégénérescence, le tissu se

gonfle, les cellules perdent leur cytoplasme, tandis que leur noyau se pycnose.

L'axe squelettique se trouve ainsi constitué de cellules en dégénérescence qui se résorbent de plus en plus. L'ensemble des cellules dégénérées dilate de plus en plus la partie axiale de l'ébauche squelettique. Pendant un certain temps les portions corticales (future zone périchondrale) de ces ébauches persistent et s'écartent de plus en plus (Fig. D, Planche 1; et Fig. J, Planche 3). La dégénérescence débutant par l'extrémité apicale et se propageant progressivement vers les régions proximales, les zones de cytolysse distales sont plus avancées et par suite plus grandes. L'axe prend ainsi un aspect cavitaire très large distalement. Les éléments corticaux qui la bordent prennent de ce fait un aspect en entonnoir. Ce stade est d'ailleurs temporaire et cette région corticale finit par se détruire à son tour. Les pièces squelettiques des doigts ont ainsi disparu complètement. Ces altérations s'étendent jusqu'à l'extrémité distale des métacarpiens ou des métatarsiens qui sont superficiellement atteints; de ce fait sur les fœtus plus âgés, ils semblent ainsi se terminer par des parties élargies en cupule.

Le résultat fondamental de ces lésions est donc la destruction totale de certains doigts et par suite une ectrodactylie.

DISCUSSION

Des lésions hémorragiques ou d'aspect hémorragique ont été observées chez l'embryon à la suite de carences, d'intoxications, et aussi sous l'influence de facteurs génétiques.

Un certain nombre de carences produisent des accidents hémorragiques manifestes chez l'embryon. C'est en particulier le cas de l'avitaminose E (Mason, 1943; Adamstone, 1931), de l'avitaminose K (Plum & Dam, 1949). Browne, Fudge, & Richardson (1947) réalisant chez la rate une carence en vitamine K et en acides gras essentiels ont observé un grand pourcentage d'hémorragies cérébrales chez les petits à la naissance. Moore, Billinger, Miller, & Hellman (1942) ont vu par carence K chez le lapin des hémorragies rétroplacentaires provoquant l'avortement. Avec le dicoumarol, antagoniste de la vitamine K, Kraus, Perlow, & Singer (1949) sur le lapin, et Quick (1946) sur le chien, ont signalé des hémorragies chez le fœtus. La carence en acide linoléique, comme l'a vu M. Martinet (1952), peut provoquer l'apparition d'hémorragies chez le fœtus de rat dans une grande proportion. Ces hémorragies se rencontrent essentiellement au milieu de la queue et au voisinage de la main ou du pied. Elles sont diffuses et dissocient les tissus. Elles peuvent entraîner des nécroses de l'épiderme, du muscle ou même de l'extrémité du membre.

Avec une série de toxiques on peut observer aussi des accidents hémorragiques chez l'embryon. Ainsi Ancel (1942) a vu chez l'embryon de poulet que certaines substances comme le bleu trypan ou le sulfate quinine provoquent des hémorragies, entre autres des ruptures de la partie terminale des aortes. Dans ce cas l'hémorragie consécutive peut endommager mécaniquement les ébauches

caudaux et provoquer diverses malformations localisées telles que la coelosomie, l'anourie ou des malformations des membres.

Jost (1950) a constaté que certains extraits hypophysaires implantés à l'embryon provoquaient des lésions hémorragiques suivies de nécroses. Il a établi qu'il s'agissait, dans ce cas, d'une substance contractant les vaisseaux: la vasopressine; mais il a constaté de plus que certaines substances hypertensives, telles que l'adrénaline, agissent de même. Les accidents progressent de la façon suivante: il y aurait d'abord des troubles vasculaires suivis d'œdème. Des ampoules claires superficielles apparaîtraient et ensuite se rempliraient de sang. Il se produirait secondairement des nécroses aboutissant, selon le cas, à la chute du membre ou de la partie distale de la queue. L'âge du fœtus est important; chez le fœtus de 18 jours, la sensibilité a disparu, elle est manifeste entre le 17^e et le 15^e jour. La position des lésions, variable avec le stade où est fait le traitement, indique qu'elles seraient en rapport avec une maturation céphalo-caudale des vaisseaux. Les lésions de la queue sont les plus difficiles à réaliser, elles nécessitent des doses élevées de vasopressine.

Récemment, après injection de bleu trypan à la rate au 9^e jour de la gestation, Murakami (1953) a observé chez le fœtus des bulles sous-épidermiques qui tendent à devenir hémorragiques. Chez la souris, Waddington & Carter (1953) ont signalé également à la suite d'injections de bleu trypan des hématomes au niveau de la queue et de la tête. Ils ont aussi noté l'apparition de bulles sous-épidermiques, mais sans spécifier leurs relations avec les lésions hémorragiques.

Par ailleurs, des accidents très analogues, d'origine génétique, ont été observés depuis longtemps. Greene & Saxton (1939), chez une souche de lapin, ont décrit une brachydactylie caractérisée par la perte d'une partie plus ou moins importante de l'extrémité des membres. Elle s'accompagne aussi d'une destruction de l'extrémité des oreilles. Au début, il apparaît des hémorragies, elles sont suivies de nécroses et le tout se termine par des amputations plus ou moins importantes.

Chez une souche de souris où des mutations se sont probablement produites à la suite de l'exposition aux rayons X, Little & Bagg (1924) ont vu des lésions hémorragiques se terminant par des malformations des yeux et des pattes (syndactylie, poly-dactylie, pieds bots, amputations). Pour Bagg, il y aurait d'abord des ampoules remplies de lymphé, qui deviendraient ensuite hémorragiques. Selon Plagens (1933) il se produit d'abord des bulles qui se résorbent. Plus tard il se forme dans les vaisseaux périphériques des thrombi qui seraient les facteurs déterminants des malformations. Bonnevie considère qu'à l'origine il y aurait une issue de liquide céphalorachidien à partir du 4^e ventricule. Ce liquide viendrait s'accumuler sous l'épiderme sous forme de vésicules qui pourraient ensuite se déplacer: arrêtées en divers points, et spécialement au niveau des membres, elles deviendraient hémorragiques et provoqueraient des altérations locales du développement.

Jost (1951) qui a proposé, pour désigner toutes ces amputations terminales, le

nom d'acroblapsie, fait remarquer que ces amputations d'origine génétique sont analogues à celles obtenues par injection de vasopressine et il a envisagé qu'elles pourraient procéder d'une libération anormale d'hormone post-hypophysaire par le fœtus.

Par ailleurs Jost (1953) examinant la théorie même de Bonnevieu (1934) note que les faits embryologiques invoqués en faveur d'une sortie du liquide céphalorachidien suivie d'une migration, ne sont pas démonstratifs. En effet, Bonnevieu se base essentiellement sur le fait que, suivant les stades, on trouve d'abord ces vésicules dans la région céphalique, puis, secondairement, au niveau du tronc et des membres: or, ces distinctions chronologiques ne sont pas évidentes.

Personnellement nous n'envisageons pas non plus comme exacte la conception de Bonnevieu: ni surtout son extension à certains syndromes cliniques comme le pterygium colli (Giroud). L'origine céphalorachidienne ne nous paraît pas évidente du fait que ces bulles se forment alors même que le tube nerveux est complètement ouvert, comme il ressort des figures de Waddington & Carter (1953). Dans notre cas particulier, ces bulles n'interviennent pas dans les lésions caractéristiques.

Les lésions observées dans la carence en acide pantothénique présentent, dans l'ensemble, une topographie analogue à celle qu'à observée Jost après injection de vasopressine. Elles sont en effet localisées surtout aux membres postérieurs et aux membres antérieurs, leur aspect extérieur paraît très semblable. On en trouve dans les deux cas au niveau de l'extrémité caudale. Cependant, histologiquement, les lésions, telles que nous les avons observées, paraissent très différentes. Les bulles sérénuses sous-épidermiques que nous avons observées, rarement d'ailleurs, n'ont pas de rapports avec nos lésions. Notre description se rapproche de celle de Plagens (1933).

Comme nous l'avons dit, ce que nous observons paraît être essentiellement constitué par une stase sanguine avec dilatation veineuse et accumulation de sang qui se trouve secondairement au contact direct des tissus.

Il en résulte des processus de dégénérescence tissulaire qui envahissent les pièces squelettiques terminales et entraînent leur résorption.

D'une façon générale on assiste ainsi à un type particulier de malformations, consistant en une dégénérescence secondaire d'ébauches déjà mises en place. C'est ce qui se produit chez l'animal dans les cas d'acroblapsie expérimentale ou génétique. Il nous paraît possible que certains cas d'ectromélie ou des cas dits d'amputation, observés chez l'homme, résultent de processus du même ordre.

RÉSUMÉ

1. Des rates ont été soumises à un régime synthétique complet mais dépourvu d'acide pantothénique. Elles ont été ensuite fécondées, et les fœtus ont été prélevés le 21^e, 18^e, 16^e, et 15^e jour.

2. Nombre de fœtus sont atteints d'exencéphalie, d'anophthalmie, d'œdème et d'altérations des membres.

3. Au 21^e jour, l'extrémité des membres apparaît boursouflée et rougeâtre. L'examen histologique à divers stades (surtout le 16^e jour) révèle qu'il y a d'abord une stase veineuse dans les veines marginales très dilatées. Il se forme alors par coagulation des amas sanguins, l'endothélium vasculaire disparaissant et ces amas viennent au contact des tissus. Des éléments squelettiques voisins peuvent être déformés par pression.

4. Surtout, les tissus subissent au contact du sang, une cytolysé qui détruit les ébauches squelettiques des doigts. Il en résulte une ectrodactylie. L'épiderme peut aussi dégénérer de la même façon en certains points, et les liquides accumulés et le sang peuvent s'éliminer.

5. Ces faits sont comparés avec d'autres accidents vasculaires et hémorragiques, en particulier avec ceux qui entraînent des amputations.

SUMMARY

1. Female rats were given a synthetic diet devoid of pantothenic acid. They were then mated and the foetuses were examined on the 21st, 18th, 16th, and 15th days of gestation.

2. Many foetuses were malformed. They exhibited exencephaly, anophthalmia, oedema, and alterations of the limbs.

3. The extremities of the limbs on the 21st day were red and irregularly swollen. Histological examination on the 16th day showed that an arrest of blood circulation in the dilated marginal veins had occurred. The vascular endothelium had then disappeared, and the coagulated blood had come in direct contact with the tissues.

4. Some skeletal elements may be distorted by the resulting pressure. Above all, there is a degeneration of the tissues in contact with the blood. The skeletogenous tissues of the digits degenerate and this results in ectrodactyly. The epidermis in some areas degenerates and the accumulated fluids and blood may be eliminated.

5. These data are compared with other data concerning embryonic hemorrhagic processes, especially those producing limb amputation.

Travail facilité par une aide de la Sécurité Sociale.

TRAVAUX CITÉS

ADAMSTONE, F. B. (1931). The effect of vitamin E deficiency on the development of the chick. *J. Morph.* **52**, 47-89.

ANCEL, P., & LALLEMAND, S. (1942). Sur le pouvoir tératogène des hémorragies déterminées par des substances chimiques chez l'embryon de poulet. *Arch. Phys. biol.* **16**, n. 59, suppl.

BAGG, H. J. (1929). Hereditary abnormalities of the limbs, their origin and transmission. II. A morphological study with special reference to the etiology of club-feet, syndactylism, hypodactylism and congenital amputation in the descendants of X-rayed mice. *Amer. J. Anat.* **43**, 167-219.

BONNEVIE, K. (1934). Embryological analysis of gene manifestation in Little and Bagg's abnormal mouse tribe. *J. exp. Zool.* **67**, 443-520.

BROWNE, E. E., FUDGE, J. F., & RICHARDSON, L. R. (1947). Diet of mother and brain hemorrhages in infant rats. *J. Nutrit.* **34**, 141-51.

GREENE, H. S. N., & SAXTON, J. A. (1939). Hereditary brachydactylia and allied abnormalities in the rabbit. *J. exp. Med.* **69**, 301-4.

JOST, A. (1950). Dégénérescence des extrémités du fœtus de rat sous l'action de certaines préparations hypophysaires. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **144**, 1324-7.

— (1951). Sur le rôle de la vaso-pressure et de la cortico-stimuline (A.C.T.H.) dans la production expérimentale de lésions des extrémités fœtales (hémorragies, nécroses, amputations congénitales). *C.R. Soc. Biol., Paris*, **151**, 1805-8.

— (1953). La dégénérescence des extrémités du fœtus de rat sous des actions hormonales (acrobapsie expérimentale) et la théorie des bulles myélencéphaliques de Bonnevie. *Arch. franç. Pédiat.* **10**, 1-6.

KRAUS, A. P., PERLOW, S., & SINGER, K. (1949). Danger of dicoumarol treatment in pregnancy. *J. Amer. med. Ass.* **139**, 758-62.

LEFEBVRES, J. (1951). Rôle tératogène de la déficience en acide pantothenique chez le rat. *Ann. Méd.* **52**, 225-9.

LITTLE, C. C., & BAGG, H. J. (1924). The occurrence of four inheritable morphological variations in mice and their possible relation to treatment with X-rays. *J. exp. Zool.* **41**, 45-91.

MARTINET, M. (1952). Hémorragies embryonnaires par déficience en acide linoléique. *Ann. Méd.* **53**, 286-333.

MASON, K. E. (1943). Hemorrhagic state in vitamin E-deficient fetus of rat. *Essays in Biology*, 399-409. Berkeley and Los Angeles: University of California Press.

MOORE, R. A., BILLINGER, I., MILLER, M. L., & HELLMAN, L. M. (1942). Abortions in rabbits fed a vitamin K deficient diet. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **43**, 1007-12.

MURAKAMI, U. (1953). Artificial induction of pseudoencephaly, short-tail, taillessness, myelencephalic blebs and some fissure formations (phenocopies) of the mouse. *Nagoya J. med. Sci.* **15**, 185.

PLAGENS, G. M. (1933). An embryological study of a special strain of deformed X-rayed mice. *J. Morph.* **55**, 151-83.

PLUM, F., & DAM, H. (1940). K-avitaminose som aarsag til blødninger hos nyfødte og hos ældre spædborn. *Ugeskr. Læg.* **102**, 1029.

QUICK, A. J. (1946). Experimentally induced changes in the prothrombin level of the blood. *J. biol. Chem.* **164**, 371-83.

WADDINGTON, C. H., & CARTER, T. C. (1953). A note on abnormalities induced in mouse embryos by Trypan blue. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 167-80.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1

FIG. A. Patte de fœtus du 16^e jour à veine marginale (*V*) très dilatée à l'extrémité de la palette. On voit un thrombus sanguin (*Th*) dans une des lumières de la veine.

FIG. B. Patte de fœtus du 16^e jour. À gauche, veine marginale très dilatée (*V*). À droite, thrombus (*Th*) et cytolysé au voisinage.

FIG. C. Patte de fœtus 16^e jour avec thrombus (*Th*). Plage de cytolysé (*C*) attaquant l'extrémité du squelette.

FIG. D. Patte de fœtus du 16^e jour. Thrombi et zones de cytolysé (*Cy*) détruisant le squelette de 3 doigts.

PLANCHE 2

FIG. E. Patte de fœtus du 17^e jour. Lésion vésiculo-sanguine. Doigts détruits.

FIG. F. Patte de fœtus du 17^e jour. À gauche veine marginale dilatée (*V*), à droite amas sanguin (*S*) au contact des tissus. Vésicule d'origine cytolytique.

FIG. G. Patte de fœtus du 19^e jour. A gauche petite vésicule sous-épidermique (*Ves*). Torsion des pièces squelettiques au contact de l'amas sanguin.

FIG. H. Patte de fœtus du 19^e jour. Torsion des pièces squelettiques au contact de l'amas sanguin.

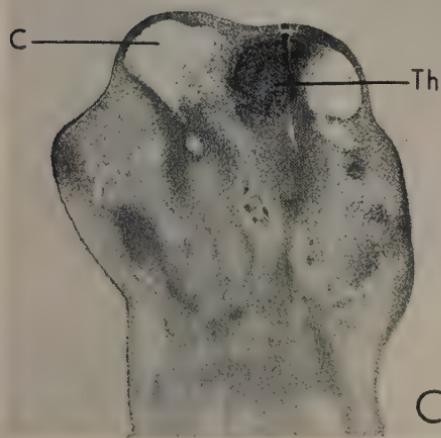
PLANCHE 3

FIG. I. Extrémité de la patte d'un fœtus du 16^e jour. Cytolyse au contact de l'amas sanguin.

FIG. J. Extrémité de la patte d'un fœtus du 16^e jour. Zone de cytolysé détruisant les axes des ébauches squelettiques de deux doigts.

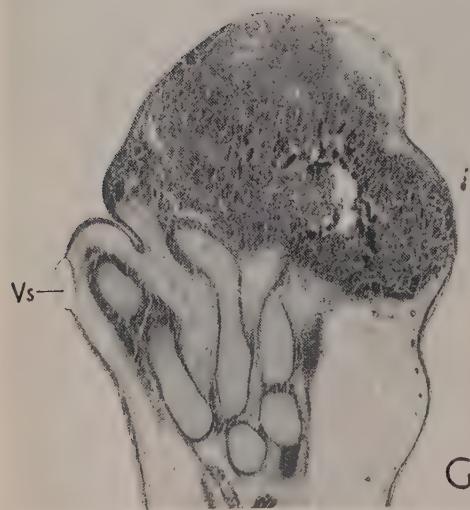
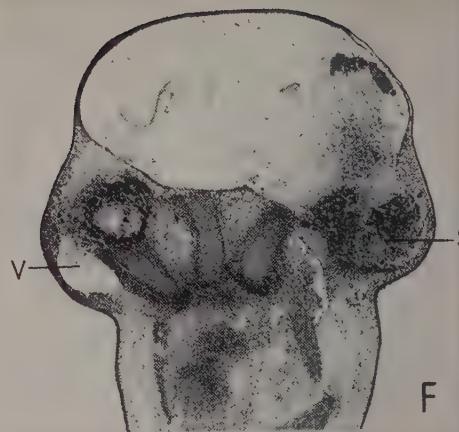
FIG. K. Extrémité de la patte d'un fœtus du 21^e jour. Destruction de l'épiderme au contact de l'amas sanguin.

(*Manuscript received 20 : iii : 54*)



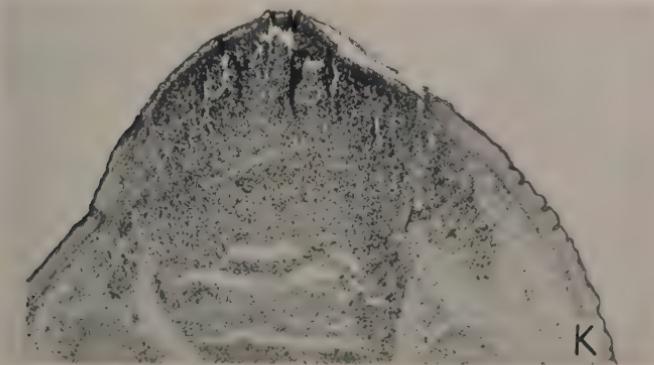
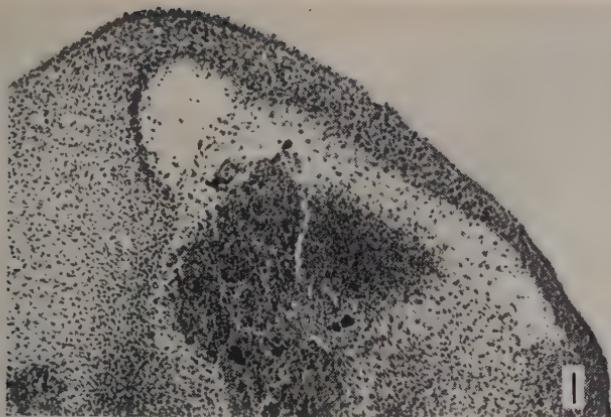
A. GIROUD, J. LEFEBVRES, H. PROST, & R. DUPUIS

Planche 1



A. GIROUD, J. LEFEBVRES, H. PROST, & R. DUPUIS

Planche 2



A. GIROUD, J. LEFEBVRES, H. PROST, & R. DUPUIS

Planche 3

Foetal Death in the Rat

by J. F. D. FRAZER¹

From the Department of Physiology, St. Mary's Hospital Medical School, London

INTRODUCTION

IN the course of work on the pregnant rat it became apparent that unnecessary difficulties in the assessment of results were encountered simply because of the variable number of foetuses which might be found in any one mother. During the last few years an attempt had been made to remedy this by 'standardizing' the number of foetuses in each mother to 6, any excess being destroyed. Laparotomy at an early stage of pregnancy was required for this purpose. In the course of this laparotomy it was found that there were frequently several implantation sites from which the foetuses had already been completely resorbed, and on occasion entire litters had disappeared. Apart from this, it had already been noted that the number of litters born was consistently much less than the number of matings (as judged by the results of vaginal smears).

In the literature, figures for the size of litters at birth have been found to differ markedly. In the wild *Rattus norvegicus* mean litter number was found to range from 5·6 (Feldman, 1926) to 10·5 (Miller, 1911). Perry (1945) found variation in the number of corpora lutea distributed from 3 to 18. In the tame rat, a domesticated form of this species, Slonaker & Card (1918) found an average of 4·5 young per litter, but Hanson & Sholes (1924) reported 5·97 to 6·26, while King & Stotsenburg (1915) gave 7 young per litter as the average. Long & Evans (1922) gave mean figures of 10·4 ova ovulated, 9·6 implanted, but only 6·4 young born. Flynn (1952), on the other hand, has bred consistently from a strain developed to give 10 young at a birth, so that now very few females of this strain produce less than 10 in a litter. King (1915) has pointed out that there is variation in litter size with maternal age, very young and aged mothers producing smaller litters.

In the wild rat Perry (1945) found that from 5 to 15 per cent. of foetuses were lost between ovulation and a few days after implantation. In the tame form loss has been known to occur between implantation and parturition. With Long & Evans's mean figure of 9·6 ova implanted goes that of 6·4 young born. This

¹ Author's address: Department of Physiology, Charing Cross Hospital Medical School, Chandos Place, London, W.C.2, U.K.

The work described formed part of a thesis accepted in fulfilment of the regulations for the degree of Ph.D. in the University of London.

implies a loss of one young in every three during the time they were implanted. Perry suggested that about 12·2 per cent. of the young implanted were lost by term, but he failed to take account of whole litters which might have been lost, as he was dealing with a population of wild rats where he could not control dates of mating.

In view of these findings on loss of foetuses it was decided to keep a careful record of the facts about the number of foetuses found at laparotomy, and to compare these with the numbers later in pregnancy with a view to investigating the incidence of foetal death and possible factors related to it.

METHODS

Two different strains of rats were used. One consisted of the offspring of crosses between the Lister hooded strain (from the Bernhard Baron Institute of the Middlesex Hospital, London) and the Wistar albino strain (from the laboratories of Messrs. Glaxo, Ltd., Greenford, Middlesex). They have formed a mixed stock and have been interbred amongst themselves since 1942 (but not line-bred). This strain is referred to as Strain C and has been used for a great part of the experimental work. These rats are of a rather small size and there is a wide range of coat-colour. The other rats used (and referred to as Strain B) were Wistar albinos. In each case the males used were of the same strain as the females.

Techniques of investigation

Vaginal smears were taken daily and examined unstained. Mating was determined by the presence either of a vaginal plug (which was found only on rare occasions) or of spermatozoa in the smear or of both. The date of this discovery was called 'Day 0' of pregnancy. With this terminology pregnancy normally lasted 21–22 days, and Huggett & Pritchard (1945) have stated that implantation in the C Strain occurs at the 7th day.

Laparotomy was performed on most of the pregnant rats at the 9th day of pregnancy. At this age conceptuses are a few millimetres across and easily identifiable: sites from which conceptuses have already disappeared are well marked by darkly pigmented spots. Sterile cotton was used for sewing up the deeper layers after laparotomy and Michel clips for the skin incision. In many cases where more than 6 foetuses were found at laparotomy, the number was reduced to 6 by rupturing the amniotic sac through the uterine wall (Huggett & Pritchard, 1945). Records were kept of living and dead foetuses and were subsequently checked with their situation at autopsy.

For statistical purposes comparison of one group of mothers was made against another, using the χ^2 test, corrected for continuity, where n was 1 in each case (Fisher, 1948). A level of significance was taken of $p < 0.05$. Where values of χ^2 were on the borderline of significance, the probability was calculated by the exact method of Fisher (as expounded by Mainland, 1948). Whenever an exact

probability value to three significant figures is given in a table, this exact method has been used. Other probabilities relate to the χ^2 test.

RESULTS

Even before the laparotomy technique had been developed it had become apparent that the number of litters born to the Strain C rats was very much at variance with the numbers mated. For example, from one series of 131 recorded matings there were only 59 litters born. Further, when these results were grouped together according to the weight (and so the age) of the females, interesting differences were found: these are shown in Table 1. It is seen that the heavier

TABLE 1

Strain C. Relation between maternal weight and fertility and litter size at term

	Females			Young		
	Served	Delivered		No. born	Mean number of young per female	
		No.	%		Mated	Delivered
Heavy rats (180 g. +)	52	13	25	45	0·9	3·5
Light rats (135 g. to 179 g.)	79	46	58	297	3·8	6·5

Comparison of number of females mated against the number delivered between the two groups gives a significant difference ($\chi^2 = 12·68$, $n = 1$, $p < 0·001$).

females had a significantly lower proportion of litters born to matings, and it is also noticeable that the older mothers produced fewer young per litter amongst those few which were born.

TABLE 2

The relation between the number of ova implanted and conceptuses present on the 9th day

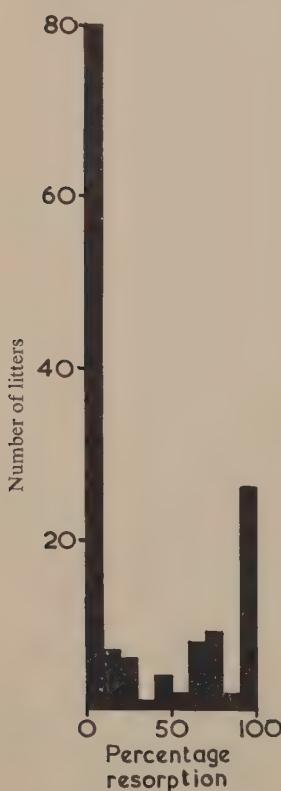
Strain C	Number of females			Ova implanted		Conceptuses present on 9th day
	Mated	Implanted	Pregnant on 9th day	Number	Per mother	
Heavy . . .	63	55	38	476	8·7	247
Light . . .	107	90	86	751	8·33	576
TOTAL . . .	170	145	124	1227	8·5	823

The results of laparotomy on a series of 145 mated females of this strain gave the findings shown in Table 2, in which heavy and light females have again been differentiated. The results show that there was no very marked difference in the number of ova implanted with maternal age, but that foetal loss between implantation and the 9th day of pregnancy was twice as heavy in the older mothers as in the younger. Similar results are given for litters followed after the 9th day of pregnancy (Table 3).

TABLE 3

Comparison of the conditions at 9 days and at term, in the same strain of rat as in Table 2. The numbers differ from those in the last table, since not all those rats were followed up

Strain C	No. of females pregnant at		Number of young			
	9 days	Term	remaining at		lost as	
			9 days	Term	Whole litters	Individuals
Heavy	26	19	129	93	21	15 (from 108)
Light	70	63	392	327	26	39 (from 366)
TOTAL	96	82	521	420	47	54 (from 474)

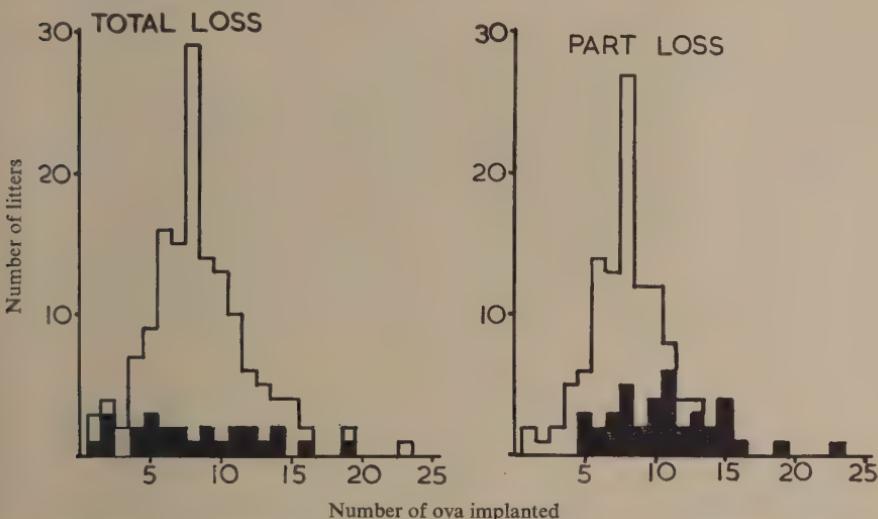


TEXT-FIG. 1. Histogram showing the number of litters against percentage resorption, in 10% stages.

Perry (1945) had suggested that loss of a few foetuses would cause loss (by death and resorption) of the neighbouring foetuses, but the results on the Strain C rats after the 9th day showed this not to be the case. For in a series of 42 females 121 surplus foetuses were killed on the 9th day, so reducing the number remaining to 6 per female: at 17 days the mean number surviving was 5·36 young per mother. Similarly, from 8 rats which each had 6 young naturally on the 9th day the mean number on the 17th day was 5·38 per mother.

Consideration of the results of laparotomy on the 145 females of Strain C (Table 2) known to have implanted ova gives rise to the distribution polygon shown in Text-fig. 1, where the numbers of litters with varying degrees of foetal loss have been plotted in steps of 10 per cent. It is apparent from this that (apart from the 80 rats where no foetal loss occurred) some distinction must be made between litters which were wholly lost and those where only some foetuses died and disappeared. Consideration of the figures produces the histograms given in Text-fig. 2, where the number of litters suffering total loss is compared with the total number of litters implanted and the number suffering partial loss with all surviving litters. In each case they are plotted against the numbers of ova originally implanted per litter. It is seen that the loss of part of a litter never occurred when less than

5 ova were implanted (as distinct from loss of whole litters), but was found in over 50 per cent. of cases where more than 10 ova were implanted. Where there was not loss of the whole litter there was invariably some loss when 14 or more ova were implanted.



TEXT-FIG. 2. Histograms showing number of litters losing some or all foetuses, assessed according to the number of ova implanted. The solid histograms represent litters suffering loss, the outline histograms represent all litters examined. Note that the total number of litters differs between the 'total loss' and 'part loss' figures, as litters which have been completely resorbed are no longer available for consideration of part loss.

Loss of complete litters

To simplify the setting out of the factors found to have been associated with foetal death, the results of a series of χ^2 tests are given in Tables 4 to 6 and 9 to 11. The factors concerned with the loss of whole litters are considered first.

TABLE 4

Strain C. Analysis of factors possibly concerned with loss of the whole litter before the 9th day

Factors	% loss	χ^2	p
<i>Number of ova implanted</i>			
1-5 (9 out of 25)	36		
11 or more (9 out of 34)	26	0.37	> 0.5
6-10 (8 out of 86)	9		
Any other number (18 out of 59)	33	9.30	< 0.01
<i>Maternal weight at mating (6-10 ova implanted)</i>			
Under 180 g. (3 out of 61)	5		
180 g. or over (5 out of 25)	20	3.16	0.0427
<i>Time of year (Females under 180 g., 6-10 ova)</i>			
September (3 out of 8)	37.5		
Other months (0 out of 54)	0	13.91	< 0.001

Strain C. (1) *Number of ova implanted.* In Strain C (Table 4) it is seen that no distinction can be made between rates of loss when less than 6 or more than 10 ova were implanted. However, there was a significant difference when between 6 and 10 ova were implanted; the rate of loss being much less than in litters where there had been greater or lesser numbers of ova.

(2) *Maternal age.* Maternal weight at the time of mating was also shown to have been a significant factor, but although more litters were lost from heavier mothers, this was found to be in part due to the abnormal number of ova implanted in these females: while consideration only of those litters which originally contained between 6 and 10 implantations shows that the difference in the rate of loss was still significant.

(3) *Season.* Examination also shows that there was apparently a further effect due to the time of year. Thus, consideration of those litters from lighter mothers who only implanted between 6 and 10 ova showed that the only three litters wholly lost followed mating in September. Comparison with the other months of the year showed that this had significance.

Other factors were looked for in vain. No variation was detected with variation in the maternal coat colour. At first it appeared as if there might be a difference due to differences in the numbers of ova in any one horn, so affecting the loss of all the ova in that horn: consideration of the individual horns only in light females with 6 to 10 ova (so as to exclude the other possible causes) showed that no difference was now detectable.

Strain B. During the following year the results of a series of laparotomies on females of Strain B were recorded. Here there was only a very low number of

TABLE 5

Strain B. Analysis of factors possibly concerned with loss of the whole litter before the 9th day

Factors	% loss	χ^2	p
<i>Maternal weight</i>			
180 g. and over (4 out of 33)	12		
Under 180 g. (4 out of 103)	4	1.76	> 0.1
<i>Number of ova implanted</i>			
1-8 (4 out of 17)	24		
9-11 (0 out of 74)	0	10.65	< 0.002
9-11 (0 out of 74)	0		
12 or more (4 out of 45)	9	4.35	0.0192
1-8 (4 out of 17)	24		
12 or more (4 out of 45)	9	1.23	> 0.2
9-11 (0 out of 74)	0		
Any other number (8 out of 62)	13	8.42	< 0.01

litters (9 out of 141) where total loss occurred. Although the loss in the older mothers differed from that in the younger, this difference was found not to approach the level of significance. It was found again (Table 5) that there was a

significant variation with the number of ova implanted, although with this strain the number of ova per litter which gave the lowest rate of litter loss was between 9 and 11. It will be remembered that the mean number of ova implanted in this strain is higher than in the C Strain. There was no significant variation with time of year.

Loss of part litters

Strain C. (1) *Number of ova.* Turning now to the loss of parts of litters only, a somewhat different set of factors is found to have held sway. In the first place it is found that there was no significant difference between the proportion of litters losing some foetuses only in the two groups where between 1 and 4 or 5 and 10 ova were implanted. These two groups are indistinguishable and can be classed as one. Further scrutiny shows that there was a markedly greater number of litters suffering some loss after implanting 11 or more ova than was the case when only 10 or less were there. This becomes apparent from Table 6.

TABLE 6

Strain C. Analysis of factors possibly concerned with loss of part litters before the 9th day

Factors	% loss	χ^2	p
<i>Number of ova implanted</i>			
1-4 (0 out of 10)	0		
5-10 (19 out of 84)	23	1.61	> 0.2
1-10 (19 out of 94)	20	29.38	< 0.001
11 or more (20 out of 25)	80		
<i>Maternal weight (10 ova or less)</i>			
180 g. or more (4 out of 28)	14		
Under 180 g. (15 out of 66)	23	0.42	> 0.5
<i>Time of year (10 ova or less)</i>			
Jan.-May (7 out of 62)	11		
June (7 out of 15)	47	5.96	< 0.02
June (7 out of 15)	47		
July-Sept. (5 out of 18)	28	0.58	> 0.3
Jan.-May (7 out of 62)	11		
July-Sept. (5 out of 18)	28	1.82	> 0.1
June (7 out of 15)	47		
Other months (12 out of 80)	15	6.24	< 0.02

(2) *Maternal age.* The question of maternal weight was considered again, but in fact it is found that (after due allowance for the number of ova) the lighter females actually suffered a greater loss, although this was only of the same degree in both groups.

(3) *Season.* The question of the season crops up again here, and again consideration had to be made of mothers who had implanted 10 ova or less. It was found that roughly 50 per cent. of pregnancies started in June lost some of the foetuses before the 9th day, and that this was an appreciably higher proportion

than at any other season of the year. The results in the other months were indistinguishable from one another.

Strain B. (1) Maternal Age. Turning to the results in the Strain B rats, it is seen from Table 7 that the lightest group of mothers had significantly less loss than the medium one ($\chi^2 = 6.63, p < 0.02$), and that these in their turn had less loss than the heavy group ($\chi^2 = 10.27, p < 0.002$). In view of the fact that in

TABLE 7
Strain B. Numbers of litters suffering some loss only

1951	Weights of mothers			All weights	
	Under 150 g.	150–179 g.	180 g. upwards	No.	%
Jan.–March	0/5	4/8	1/4	5/17	29
April–June	1/24	10/24	6/7	17/55	31
July–Sept.	2/14	3/25	3/8	8/47	17
Oct.–Dec.	0	1/2	11/12	12/14	86
ALL SEASONS . .	No. %	3/43 7	18/59 31	21/31 68	42/133 31

human cases of erythroblastosis foetalis the ill effects on the foetus are more manifest in the second and later pregnancies, note was particularly kept of the number of the pregnancy in each of the heavy mothers; but no difference was found in the incidence of foetal loss between first, second, and later pregnancies. (The figures for these were respectively 9 out of 14, 9 out of 12, and 4 out of 4.) Thus it was apparent that the effect of maternal weight was purely an age effect, and not solely due to the cumulative effect of successive pregnancies.

(2) *Season.* It was also noticeable that there was some degree of seasonal variation in the results. Thus, in the medium-weight rats there was significantly greater loss in the second than in the third quarter ($\chi^2 = 4.22, p = 0.0256$); and

TABLE 8
Strain B. Mean number of ova implanted per rat

1951	Light	Medium	Heavy	All weights
Jan.–March	9.6	11.6	13.5	11.5
April–June	9.6	12.3	13.0	11.2
July–Sept.	9.5	10.3	10.6	10.1
Oct.–Dec.	—	10.0	12.5	12.1
ALL SEASONS	9.6	11.7	12.2	—

in the whole community a much greater loss in the fourth quarter than in the third ($\chi^2 = 20.09, p < 0.001$). At first sight it seemed difficult to account for the differences being only found between those groups until the difference between the mean number of ova implanted per group came to be examined, when it became apparent that similar differences existed in these. They are given in Table 8.

(3) *Number of ova.* It therefore became necessary to examine again the correlation between the number of ova implanted and the proportion of litters suffering some foetal loss. The figures for these are given in Table 9. From them it is apparent that there was here much the same situation as in the Strain C rats. Thus, where 11 or less ova were implanted, heavy mothers suffered a much greater loss of part litters than their lighter fellows: but with greater numbers of ova, lighter mothers lost equally as greatly. At first sight it appeared as if the heavier mothers suffered less loss during the first 3 months of the year than during the later 9, but this was found to be associated with the variation in the number of ova with season. If only those mothers were considered where from 9 to 11 ova were implanted, this difference was no longer significant.

Proportion of foetuses lost. It is worth mentioning here the numbers of conceptuses found to have been resorbed in cases where only part of the litter was

TABLE 9

Strain B. Analysis of factors possibly concerned with loss of part litters before the 9th day

Factors	% loss					χ^2	p
<i>Maternal weight</i>							
(a) 8 or less ova implanted							
Medium (0 out of 3)	0	
Light (0 out of 8)	0	{ 0
Heavy (2 out of 2)	100	{ 6.45
Others (0 out of 11)	0	< 0.02
(b) 9–11 ova implanted							
Medium (4 out of 37)	11	{ 0.01
Light (2 out of 28)	7	> 0.9
Heavy (4 out of 10)	40	{ 4.69
Others (6 out of 65)	9	0.0236
(c) 12 or more ova implanted							
Medium (13 out of 19)	70	{ 0.28
Light (1 out of 3)	33	> 0.5
Heavy (16 out of 19)	79	{ 1.28
Others (14 out of 22)	65	> 0.2
<i>Number of ova implanted</i>							
(a) Females less than 180 g.							
11 or less ova (6 out of 76)	8	
12 or more ova (15 out of 23)	65	{ 31.37 < 0.001
(b) Females 180 g. or more							
11 or less ova (6 out of 12)	50	{ 2.39 > 0.1
12 or more ova (15 out of 18)	83	
<i>Season (Females 180 g. or more)</i>							
February–March (0 out of 3)	0	
Other months (22 out of 29)	76	{ 4.18 0.024

lost. In the Strain C rats no difference was found between the heavy and light mothers concerning the proportion lost from the individual litters where such loss occurred. In all, of such affected litters, 231 out of 421 young foetuses died and were resorbed. In the Strain B females there was likewise no difference

between the lighter and heavier mothers, 163 foetuses dying out of 564 in their litters: this rate of loss among the affected litters was markedly lower than in the Strain C rats. Further, it was found (see Table 9) that there was a substantially higher proportion of such litters lost during the winter months than in the summer. (Not enough results were obtained on Strain C during the winter months to say that there was any significant variation in this strain.)

Losses after the 9th day

The findings on the rate of foetal death after the 9th day also lie under a variety of headings. Table 1 shows that of 170 Strain C females which had been mated only 124 were pregnant 9 days later. It had already been found (during the previous few years) that in a series of 400 mated females only 46 per cent. came to term. Thus, if the two series are comparable there must have been a degree of foetal death after the 9th day on the same scale as that occurring before then.

Most of the mothers laparotomized were standardized to 6 foetuses on that occasion, and it was found that the sample of those killed on the 17th day averaged 5·3 foetuses each. After what has been said about the high degree of

TABLE 10

Strain C. Analysis of factors possibly concerned with loss of the whole litter after the 9th day of pregnancy

Factors	% loss						χ^2	p	
<i>Previous behaviour</i>									
Litters partially lost already (9 out of 37)	25	} 3·53	0·0341	
Other litters (5 out of 60)	8			
<i>Number of ova implanted</i>									
1-5 (5 out of 11)	45	} 1·74	> 0·1	
11 or more (4 out of 23)	17			
6-10 (5 out of 63)	9	} 0·76	> 0·3	
11 or more (4 out of 23)	17			
1-5 (5 out of 11)	45	} 8·30	< 0·01	
6-10 (5 out of 63)	9			
<i>Previous behaviour (6-10 ova)</i>									
Litters part lost (4 out of 16)	25	} 5·55	< 0·02	
Other litters (1 out of 46)	2			

loss after the 9th day, it might be imagined that this would mean that some 50 per cent. of foetuses would be lost between the 17th day and term. In fact, no further loss occurred in that period (the mean daily number of foetuses only varying from 5·2 to 5·4). So the loss after the 9th day in standardized mothers was only of the order of 13 per cent. or less. Thus it seemed that the artificial reduction in the numbers of foetuses might have been favourable to the continued survival of the remaining ones: evidence against this has already been quoted (on p. 16), since rats which naturally had implanted only 6 ova each were found at the 17th day to have suffered exactly the same degree of foetal loss.

Loss of whole litters after the 9th day. The data for the loss of whole litters of Strain C after the 9th day are collected in Table 10. It is seen that of the 14 litters lost, some 9 had already suffered partial loss before the 9th day. The difference between the groups which had and had not already suffered loss is just significant. However, when considering the numbers of ova implanted against the litters lost a more highly significant difference is found, so that the implantation of abnormal numbers of ova is correlated directly with an increased loss of whole litters. In this case it should be noted that the abnormal number (unlike the number affecting loss before the 9th day) was between 1 and 5 ova, and that mothers which had implanted excessive numbers of ova did not suffer any abnormal degree of loss. Once the mothers with low numbers of ova had been separated off it became apparent that there was amongst the other mothers a difference in behaviour

TABLE 11

Strain B. Analysis of factors possibly concerned with the loss of whole litters after the 9th day of pregnancy

Factors	% loss	χ^2	p
<i>Number of the pregnancy</i>			
2nd litters (1 out of 12)	9		
Later litters (1 out of 4)	25	0	1
1st litters (4 out of 42)	9	0.02	> 0.9
Other litters (2 out of 16)	13		
<i>Number of ova implanted</i>			
Less than 9 (1 out of 9)	11		
12 or more (4 out of 20)	20	0.15	0.7
9–11 (1 out of 29)	4	1.67	> 0.1
Any other number (5 out of 29)	17		
9–13 (1 out of 37)	3	6.24	< 0.02
14 or more (4 out of 12)	33		
Less than 9 (1 out of 9)	11	0.44	> 0.5
14 or more (4 out of 12)	33		
9–13 (1 out of 37)	3	4.36	0.0197
Any other number (5 out of 21)	25		
<i>Previous loss of some foetuses</i>			
Previous loss (4 out of 25)	16		
No previous loss (2 out of 33)	6	0.63	> 0.3
<i>Maternal weight</i>			
Heavy mothers (1 out of 16)	7		
Light mothers (5 out of 42)	12	0.00	> 0.95

between litters which had and had not already suffered loss. Those litters which had lost some foetuses before the 9th day showed a greater tendency thereafter to lose the rest of their foetuses. In the case of Strain B (Table 11) there was no such tendency after some loss had already occurred, but there was increased loss of litters where abnormal numbers of ova had been implanted: in this case abnormal numbers were any outside the range of 9 to 13. In this strain very few mothers implanted less than 9 ova, and the rate of loss of such litters was not

shown to differ from that in litters consisting of abnormally high numbers of young.

TABLE 12

Strain C. Analysis of factors possibly concerned with loss of part litters after the 9th day of pregnancy

Factors	% loss	χ^2	p		
<i>Number of ova implanted</i>					
1-5 (1 out of 6)	17	0.90	> 0.3		
6-10 (26 out of 58)	45				
1-5 (1 out of 6)	17	1.39	> 0.2		
11 or more (10 out of 19)	53				
6-10 (26 out of 58)	45	0.11	> 0.7		
11 or more (10 out of 19)	53				
1-5 (1 out of 6)	17	0.96	> 0.3		
6 or more (36 out of 77)	47				
1-10 (27 out of 64)	42	0.29	> 0.5		
11 or more (10 out of 19)	53				
<i>Maternal weight</i>					
Heavy mothers (14 out of 25)	56	1.29	> 0.2		
Light mothers (23 out of 58)	40				
<i>Maternal coat colour</i>					
Black (11 out of 18)	61	6.24	< 0.02		
Other colours (not white) (9 out of 39)	23				
White (17 out of 26)	65	0.00	> 0.95		
Black (11 out of 18)	61				
White (17 out of 26)	65	9.94	< 0.01		
Colours (not black) (9 out of 39)	23				
Hooded (6 out of 15)	40	0.03	> 0.8		
Non-hooded (14 out of 42)	33				
Hooded (except black) (4 out of 12)	33	0.36	> 0.5		
Non-hooded (except black) (5 out of 27)	18				
<i>Previous loss of some foetuses</i>					
Previous loss (15 out of 28)	54	0.89	> 0.3		
No previous loss (22 out of 55)	40				
B. EXCLUDING WHITE AND BLACK FEMALES					
<i>Maternal weight</i>					
Heavy mothers (3 out of 11)	27	0.00	> 0.95		
Light mothers (6 out of 28)	18				
<i>Number of ova implanted</i>					
1-5 (0 out of 4)	0	0.16	> 0.5		
6-10 (6 out of 26)	23				
1-5 (0 out of 4)	0	0.36	> 0.5		
11 or more (3 out of 9)	33				
6-10 (6 out of 26)	23	0.03	> 0.9		
11 or more (3 out of 9)	33				
<i>Previous loss of some foetuses</i>					
Previous loss (6 out of 13)	46	4.06	0.0386		
No previous loss (3 out of 26)	12				

Loss of part litters after the 9th day. Turning to the factors associated with the loss of part litters after the 9th day (Table 12), it was found that in Strain C there was a marked variation with maternal coat colour, both black and white

mothers having an abnormally high rate of foetal loss, over half their litters being affected. Apart from this, in the other mothers where a high number of litters

TABLE 13

Strain B. Analysis of factors possibly concerned with the loss of individual foetuses from litters after the 9th day of pregnancy

Factors	% loss	χ^2	p
<i>Number of ova implanted</i>			
Less than 9 (2 out of 8)	25		
More than 13 (5 out of 8)	63	1.02	> 0.3
9–13 (13 out of 36)	36		
Any other number (7 out of 16)	44	0.05	> 0.8
<i>Number of pregnancy</i>			
First (14 out of 38)	37		
Later (6 out of 14)	43	0.01	> 0.9
<i>Previous loss of some foetuses</i>			
Previous loss (9 out of 21)	43		
No previous loss (11 out of 31)	36	0.06	> 0.8
<i>Maternal weight</i>			
Heavy mothers (8 out of 15)	53		
Light mothers (12 out of 37)	33	1.58	> 0.2
Heavy mothers (9–13 ova) (4 out of 9)	44		
Light mothers (9–13 ova) (9 out of 27)	33	0.04	> 0.8

TABLE 14

Summary of the factors found to be associated with abnormally high degrees of foetal loss

	<i>Loss of whole litters</i>	<i>Loss of part litters only</i>
BEFORE 9 DAYS		
<i>Strain C</i>		
Less than 5 ova implanted	Yes	No
More than 10 ova implanted	Yes	Yes
Time of year	Sept.	June
Heavy mothers	Yes	No
<i>Strain B</i>		
Less than 8 ova implanted	Yes	No
More than 12 ova implanted	Yes	Yes
Heavy mothers	No	Yes
Time of year	No	Apr.–Nov.
AFTER 9 DAYS		
<i>Strain C</i>		
Less than 5 ova implanted	Yes	No
Previous loss of foetuses	Yes	Yes
Maternal coat colour	No	White and black
<i>Strain B</i>		
More than 13 or less than 9 ova implanted	Yes	No

suffered some foetal loss, this was correlated with the incidence of foetal loss before the 9th day. In the Strain B rats this correlation was not found to hold.

In fact, in this strain (Table 13) nothing was detected which might be associated with a marked degree of loss of individual foetuses after the 9th day.

Proportion of foetuses lost after the 9th day. Examination of the numbers of young lost from surviving litters after the 9th day shows that in Strain C the same proportion of young was lost from those litters of black (35 out of 74) and white (72 out of 147) mothers where such loss occurred. The mothers (neither black nor white) who had already lost some young before the 9th day showed a similar degree of loss to the black and white mothers (18 young out of 47). But this loss of 50 per cent. of the foetuses from affected litters was on the same scale as the loss from other litters, which was a matter of 14 foetuses out of 27. In other words, the degree of foetal loss was the same in the various litters affected, but the number of litters so affected varied with the factors mentioned. In the case of Strain B the degree of loss from affected litters was only half this—27 out of 118 foetuses.

The factors found to have been associated with foetal loss (whether as whole litters or parts of litters) are summarized in Table 14.

DISCUSSION

It was particularly noticeable that great foetal loss was found when abnormal numbers of ova were implanted. Thus this occurred when small numbers were implanted, both before and after the 9th day, in both the strains of rat investigated. Since the loss of whole litters was particularly marked, it is unlikely that there was some local factor at work, but rather something general which was affecting the foetal environment in both uterine horns and at all places in those horns. Such a general effect could be the consequence of either some nervous mechanism controlling both horns equally or else the action of a hormone. The evidence is insufficient for a decision on this point.

The fact that there was a high degree of loss of both whole and part litters when large numbers of ova were implanted suggested at first that this might have been due in some manner to the crowding of the ova in the horns. In support of this idea was the work of Fawcett, Wislocki, & Waldo (1947), who had shown that an ovum implanted in the anterior chamber of the eye would inhibit the growth of others near it. However, the data given in Table 15 do not support this premiss. Twenty-three females have been considered where part of the litters were lost and where different numbers of ova were implanted in the two uterine horns. The percentage resorption was the same in both horns, although the local effect of one ovum upon its neighbour could not be held to have occurred in those horns which averaged only 4·2 implantations each. Thus the effect of high numbers of ova implanted is correlated with that high total number and not with the overcrowding implicit in this. Brambell & Rowlands (1936) produced similar findings in the bank vole.

The other question to be considered in loss of foetuses before the 9th day is that of maternal weight. Since the female rat grows steadily throughout life, this

is a question of age. The heavier mothers of both strains had suffered greater loss than the others, even apart from those where there had been an abnormal number of ova implanted. It might have been considered that the effect in rats was due to some antibody reaction between mother and foetus, when it would be expected that the effect would not be found in the earlier pregnancies of

TABLE 15

Data from 23 females of Strain C where different numbers of ova were implanted in the two horns, and where some foetuses of the litters were lost. The loss totalled in all the horns where the greater number were implanted is assessed against that in the horns where the lesser number were implanted. $\chi^2 = 0.17$, $n = 1$, $p > 0.7$

Ova in horn	Total number of ova implanted	Foetal loss	
		Number	%
More	158	78	49
Less	96	44	46

such a mother. For example, this has been shown to be the case in man for iso-agglutinogen A and its antibody by Waterhouse & Hogben (1947). It was found, though, in the rats that the rank of pregnancy made no difference to this effect: heavy rats in their first pregnancy were just as likely to suffer loss as those in their third or fourth. The effect was apparently purely one of age. Asdell, Bogart, & Sperling (1941) reported a reduction in litter size when elderly rats were bred for the first time. This would appear to be the same foetal death effect.

After the 9th day the same factors which were active for foetal loss before this period held sway, at least in part. Loss of whole litters with low numbers of ova continued to take place, but in Strain B the heavy mothers suffered no further marked losses. In Strain C the maternal coat colour was of importance: both black and white mothers lost abnormally high numbers of individual foetuses. This suggested the possible importance of the genetic constitution of the female parent, but not enough is known of the genetics of this strain (Grüneberg, 1953).

The possibility that a particular strain of rat may provide a better environment (whether hormonal or not) for the developing ovum than another strain is made greater by the findings of Fekete (1947) in the mouse. She showed that when fertilized ova were transplanted to other mice there was a much better survival rate in one strain of recipient than another one, from whichever of these two strains the donors came. It is a significant fact that the litter size of normal mice of this strain was much greater although the mean number of ova ovulated was less, so that there must have been a much lower level of foetal death under natural conditions also.

So far, apart from evidence to show that loss of foetuses after the 9th day had already taken place by the 17th, there has been no comment on the time when

such loss might have occurred. It has, however, been noted by Huggett & Pritchard (1945) that after the death of the foetus the placenta may either necrose and disappear or remain in the uterus, according to whether the foetal death occurs before or after the chorio-allantoic placenta has been formed. This takes place on the 11th day (Huggett & Pritchard, 1945). By considering those cases where there is definite information about foetal death and resorption after the 9th day (*not* as the result of foetal crush at the 9th day), it is seen that with 35 foetuses resorbed, 31 of the placentae had disappeared also by the time the mothers were killed. That is, 89 per cent. of foetal deaths occurred between the 9th and 11th days of pregnancy.

If foetal death occurs before the 11th day, as in cases of lack of vitamin E (Evans & Burr, 1927) or after foetal crush or removal on the 10th day (Huggett & Pritchard, 1945), there is an accompanying failure of the foetal blood-vessels to grow into the labyrinth, so that no true chorio-allantoic placenta is formed. Chesley (1931) produced evidence of a similar failure of vascularization of the placenta in mice where foetal death occurred in a particular type of homozygous animal. It seems likely that there is a similar failure in the cases of foetal death reported here as occurring about this time. The loss of foetuses was occurring at about the time when the outer wall of the yolk-sac was breaking down, and Huggett & Pritchard (1945) have suggested that at this time foetal death can be produced by a variety of causes acting along a final common path. Perry's data in the wild race (1945) suggest that here also the time of change-over from the yolk-sac placenta to the chorio-allantoic one may well be a crucial one for the foetus.

SUMMARY

1. Pregnant rats were laparotomized 9 days after mating, and the number of implantation sites and conceptuses noted.
2. These rats were killed at the end of pregnancy, and the numbers of foetuses noted.
3. From these findings assessments were made of the degree of death before and after the 9th day of pregnancy.
4. Different factors were found to be associated with loss of whole litters and of individual foetuses from litters.
5. Different factors were associated with loss before and after the 9th day of pregnancy.
6. Factors associated with loss of whole litters before the 9th day of pregnancy were the number of ova implanted and (in one strain of rat only) the time of year.
7. Loss of part litters before the 9th day was associated with high numbers of ova implanted, with older mothers, and with the time of year.
8. Loss of whole litters after the 9th day was associated with implantation of abnormal numbers of ova and with some previous loss of foetuses.

9. Loss of part litters after the 9th day was associated with some previous loss of foetuses and with maternal coat colour.

10. These findings are discussed.

Assistance with the expenses of this investigation was given by grants from the Medical Research Council and Agricultural Research Council to Professor A. St. G. Huggett. I should like to express my gratitude for this help.

REFERENCES

ASDELL, S. A., BOGART, R., & SPERLING, G. (1941). The influence of age and rate of breeding upon the sterility of the female rat to reproduce and raise young. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.* **238**, 1-26.

BRAMBELL, F. W. R., & ROWLANDS, I. W. (1936). Reproduction of the bank vole, *Erethizon glareolus*, Schreber. I. The oestrus cycle of the female. *Philos. Trans. B.* **226**, 71-98.

CHESLEY, P. (1931). Lethal action of the short-tailed mutation in the house mouse. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **29**, 437-8.

EVANS, H. M., & BURR, G. O. (1927). The anti-sterility vitaminine—fat-soluble E. *Mem. Univ. Calif.* **8**, 1-173.

FAWCETT, D. W., WISLOCKI, G. B., & WALDO, C. M. (1947). The development of mouse ova in the anterior chamber of the eye and in the abdominal cavity. *Amer. J. Anat.* **81**, 413-46.

FEKETE, ELIZABETH (1947). Differences in the effect of uterine environment upon development in the DBA and C57 strains of mice. *Anat. Rec.* **95**, 409-15.

FELDMAN, H. W. (1926). Fertility and sterility in the Norway rat, *Mus norvegicus*. *Publ. Carnegie Instn.* **337**, 49-82.

FISHER, R. A. (1948). *Statistical Methods for Research Workers*. 10th ed. Edinburgh: Oliver & Boyd.

FLYNN, F. G. (1952). Personal communication.

GRÜNEBERG, H. (1953). Personal communication.

HANSON, F. B., & SHOLES, FAITH N. (1924). Seasonal differences in sex ratio, litter size and birth weight of the albino rat under uniform laboratory conditions. *Genetics*, **9**, 363-7.

HUGGETT, A. St. G., & PRITCHARD, J. J. (1945). Experimental foetal death: the surviving placenta. *Proc. r. Soc. Med.* **38**, 261-6.

KING, HELEN D. (1915). On the weight of the albino rat at birth and the factors that influence it. *Anat. Rec.* **9**, 213-31.

— & STUTENBURG, J. M. (1915). On the normal sex ratio and the size of the litter in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). *Anat. Rec.* **9**, 403-20.

LONG, J. A., & EVANS, H. M. (1922). The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.* **6**, 1-148.

MAINLAND, D. (1948). Statistical methods in medical research: qualitative. *Canad. J. Res.* **26**, E, 1-166.

MILLER, N. (1911). Reproduction in the brown rat (*Rattus norvegicus*). *Amer. Nat.* **45**, 623-35.

PERRY, J. S. (1945). The reproduction of the wild brown rat (*Rattus norvegicus*, Erxleben). *Proc. zool. Soc. Lond.* **115**, 19-46.

SLONAKER, J. R., & CARD, T. A. (1918). The effect of omnivorous and vegetarian diets on reproduction in the albino rat. *Science*, **47**, 223-4.

WATERHOUSE, J. A. H., & HOGGEN, L. (1947). Incompatibility of mother and foetus with respect to the iso-agglutinogen A and its antibody. *Brit. J. soc. Med.* **1**, 1-17.

Le système nerveux périphérique crânien de l'embryon humain de 9 mm.

par SIMONE MASY¹

Institut d'Anatomie, Université de Louvain; Prof. Van Campenhout

AVEC DEUX PLANCHES

INTRODUCTION

L'ÉTUDE du développement progressif du système nerveux périphérique chez l'embryon humain, nous paraît indispensable à une compréhension exacte des dispositifs anatomiques réalisés chez l'adulte: ceci est particulièrement vrai pour la disposition des nerfs crâniens, dont la distribution complexe et les anastomoses fréquentes soulèvent des problèmes nombreux, que seules l'embryogénèse et l'expérimentation peuvent résoudre.

De nombreux travaux décrivent en particulier l'un ou l'autre nerf crânien: ainsi, Pearson (1938, 1941 *a* et *b*, 1943), a suivi les nerfs olfactif, terminal, spinal, et pathétique, Van Campenhout (1933, 1936 *a* et *b*) le nerf olfactif, Van Buskirk (1945) le nerf facial, etc. Les seuls travaux d'ensemble sont ceux de Streeter et de Fagnart. En 1908 (*a* et *b*) Streeter a décrit le système nerveux de l'embryon de 10 mm. et il en a donné une reconstruction complète. Ce qui frappe de prime abord dans cette étude de Streeter, c'est le développement extrêmement réduit des nerfs crâniens et surtout de leurs branches secondaires: ainsi, parmi les nerfs sensoriels, seul le nerf acoustique est assez bien développé; le nerf olfactif n'est pas visible et le nerf optique est représenté par le pédicule optique.

Les nerfs moteurs sont signalés sans anastomoses ni divisions terminales. Quant aux nerfs mixtes: le trijumeau est réduit au ganglion de Gasser et à ses trois troncs principaux. La branche ophtalmique se divise en nerfs naso-ciliaire et frontal. Pour le septième nerf crânien, Streeter ne mentionne que la corde du tympan, et pour le glossopharyngien, les branches terminales dans le troisième arc branchial. Pour les dixième et onzième nerfs, à part la branche allant aux muscles trapèze et sterno-cléido-mastoïdien, l'auteur n'indique qu'un tronc principal se terminant dans la paroi oesophagienne.

En 1950 Fagnart a publié une description précise et détaillée du système nerveux périphérique crânien de l'embryon humain de 29 mm. Cet embryon est déjà remarquablement développé et son système nerveux a une complexité

¹ Author's address: Institut d'Anatomie, Université de Louvain, 38 rue des Récollets, Louvain, Belgium.

presque comparable à celui de l'adulte: pour ne citer qu'un exemple, le nerf trijumeau montre sa série complète de ramifications et Fagnart a pu suivre les branches afférentes et efférentes des ganglions ophtalmique, ciliaire, sphéno-palatin et optique.

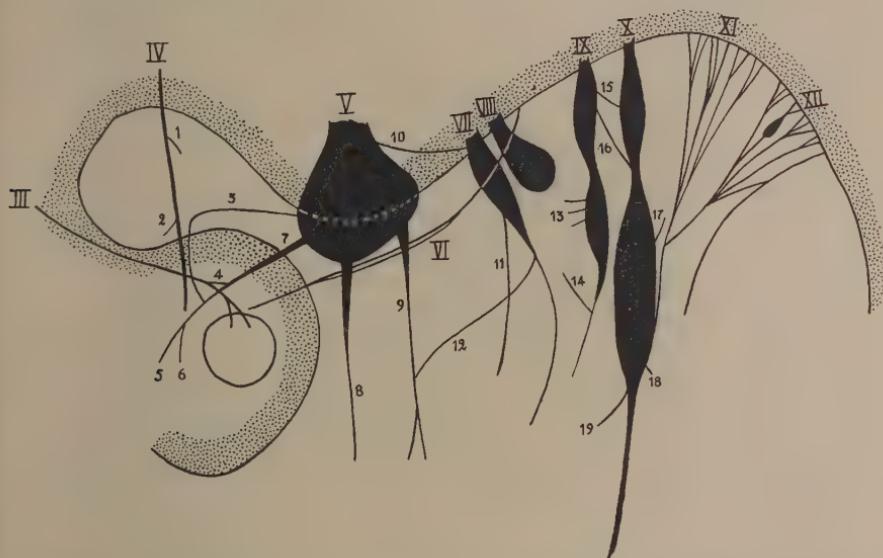


SCHÉMA 1. III: Nerf oculomoteur commun. IV: Nerf pathétique. V: Nerf trijumeau et ganglion de Gasser. VI: Nerf oculomoteur externe. VII: Nerf facial et ganglion géniculé. VIII: Nerf acoustique et ganglion. IX: Nerf glossopharyngien avec les ganglions d'Ehrenritter et d'Andersch. X: Nerf pneumogastrique avec les ganglions jugulaire et noueux. XI: Nerf spinal. XII: Nerf grand hypoglosse et ganglion de Froriep. 1 et 2: collatérales du pathétique allant au mésenchyme latéral. 3: Branche allant du ganglion de Gasser au nerf ophtalmique. 4: Anastomose nerfs oculomoteur commun et ophtalmique. 5: Nerf frontal. 6: Nerf nasal. 7: Nerf ophtalmique. 8: Nerf maxillaire supérieur. 9: Nerf mandibulaire. 10: Anastomose trijumeau et facial. 11: Branche pharyngienne du facial. 12: Corde du tympan. 13: Collatérales du glossopharyngien allant à la carotide. 14: Branche du glossopharyngien allant au pharynx. 15 et 16: Anastomoses entre les neuvième et dixième nerfs crâniens. 17 et 18: Branches allant aux muscles superficiels. 19: Nerf pharyngien supérieur.

Sur les conseils du Professeur Van Campenhout, nous avons étudié la structure du système nerveux périphérique crânien d'un embryon humain mesurant, après fixation au liquide de Bouin, 9 mm. Cet embryon avait été prélevé par le Docteur Tonneau de Namur. Il a été débité en coupes séries et la plupart des lames ont été colorées par la méthode Rogers, modifiée par Van Campenhout (1949). Quelques-unes cependant, dont l'imprégnation fut défective, ont subi la coloration trichromique de Masson.

Les nerfs ont été étudiés et leur trajet reconstitué (Schéma I), grâce à de nombreux dessins à la chambre claire; le système nerveux troncal de cet embryon a déjà été décrit par Van Campenhout en 1945.

NERF OLFACTIF

La paroi de la fente olfactive est constituée par un épithélium pluristratifié, qui présente son épaisseur maximale (environ 110 microns) au niveau du fond et du bord mésial de la fente, occupés par la zone placodique. Cette épaisseur n'est plus que de 40 microns au niveau de la partie la plus large du bord externe.

Au niveau du territoire placodique, nous avons pu observer des cellules en forme de fuseau, premier stade de la différenciation; d'autres cellules présentent une sorte de pseudopode dirigé vers la limite épithélio-mésenchymateuse. Des expansions cellulaires s'allongent, perforent la membrane basale et forment des traînées fibrillaires bien mises en évidence par la méthode de Rogers. Nous avons pu suivre trois minces faisceaux parallèles s'avancant vers le télencéphale. Les fibrilles nerveuses semblent devenir plus nombreuses en se rapprochant du système nerveux central et s'entrecroisent en tous sens. Sur certaines coupes, elles sont tellement proches du télencéphale, que nous pensons pouvoir affirmer qu'à ce stade déjà, elles sont en connexion avec le système nerveux central.

Ces observations confirment les descriptions de Van Campenhout chez l'embryon de porc (1933-6 *a* et *b*): 'les cellules sensorielles olfactives se différencient aux dépens des cellules épithéliales de la placode et ce sont leurs cylindraxes qui forment le nerf olfactif. De la face profonde de l'épithélium olfactif, émigrent des cellules épithéliales qui se transforment bientôt en cellules de Schwann.'

Le nerf olfactif est donc bien développé chez l'embryon humain de 9 mm., alors que Streeter (1908a) prétend que ce nerf n'est pas visible à la fin du premier mois. Par contre, nous n'avons pas vu, à la base de l'hémisphère cérébral, la poche que cet auteur décrit comme correspondant au début du bulbe olfactif.

Il ne nous a pas été possible de voir si les fibres du nerf olfactif étaient accompagnées de cellules schwannniennes, toutes les lames nous montrant ce nerf étant colorées par la méthode de Rogers.

NERF OPTIQUE

Le pédicule optique se présente comme un tube mettant en communication directe la vésicule oculaire et le ventricule diencéphalique. Ses parois ont la même structure que les parois cérébrales: sa paroi ventrale a une épaisseur de 132 microns, tandis que sa paroi dorsale n'atteint que 37 microns. La face ventrale du pédicule est déprimée par la fente colobomique, qui loge l'artère centrale de la rétine. Nous n'avons pas vu les fibres nerveuses, axones des cellules rétiniennes. Cependant, chez cet embryon de 9 mm., l'organe de la vision est déjà bien développé, quoique les deux feuillets rétinien ne soient pas encore accolés. Dans les cellules du feuillet externe, nous avons trouvé des grains marquant en noir par les colorations que nous avons utilisées. Nous pensons que ce sont des grains de pigment, bien que Dubreuil (1947) ne signale l'apparition de pigment que vers le stade de 14 mm. Le feuillet interne de la rétine est formé de deux couches distinctes: l'une, la plus proche de l'épithélium pigmentaire,

montre huit à dix rangs de cellules à noyaux volumineux, ovoïdes, tassés les uns contre les autres; l'autre, la plus interne, est fibrillaire: assez épaisse (54 microns) dans le voisinage du pôle postérieur de l'œil elle est presqu'inexistante à la partie antérieure du globe oculaire. De ci, de là, nous avons retrouvé les grosses cellules arrondies, à noyau de forme variable, décrites sous le nom de cellules migratrices de la zone marginale ou cellules vitréennes, par Seefelder en 1910 et par Mawas & Magitot en 1912.

Nous avons observé de très belles images se rapportant à la formation du corps vitré (Planche 1, fig. A): des cellules du feuillet interne de la rétine, qui envoient des expansions d'une longueur moyenne de 10 microns dans l'espace vitré. Ceci met en évidence la participation de l'ectoblaste à la formation du corps, suivant la théorie de Mawas & Magitot.

NERF OCULOMOTEUR COMMUN

Le troisième nerf crânien a son origine apparente à la face antérieure du mésencéphale (Planche 1, fig. B): il est formé par plusieurs fascicules de fibres nerveuses juxtaposés, qui se réunissent bientôt en un seul tronc, pour prendre alors une direction ventrale. Il croise le nerf pathétique, sans échanger d'anastomose avec lui. Il chemine du côté interne de la veine ophtalmique, tandis que du côté externe de la même veine, nous trouvons le pathétique et la branche ophtalmique du trijumeau. Le nerf oculomoteur continue son trajet légèrement oblique en bas et en dehors, en direction du globe oculaire: en passant à proximité du nerf ophtalmique, il lui envoie quelques minces filets nerveux. Non loin de l'œil, il se divise en ses deux terminales, qui s'épuisent petit à petit dans le mésenchyme, en arrière et en dedans du globe oculaire.

Nous avons observé des cellules de Schwann le long des fibres nerveuses de l'oculomoteur commun.

Signalons également, que le troisième nerf crânien a un trajet très sinueux dans sa partie moyenne, surtout du côté gauche de l'embryon.

NERF PATHÉTIQUE

Nous avons suivi la décussation du nerf pathétique dans le système nerveux central (Planche 1, fig. C) puis, son émergence à la partie dorsale du rhombencéphale: le quatrième nerf crânien commence alors un long trajet dorso-ventral, légèrement oblique en dehors. Il croise le nerf oculomoteur commun en passant en dehors de lui et sans échanger d'anastomose avec lui. À ce niveau, il envoie un mince filet nerveux vers le mésenchyme latéral. Nous le trouvons bientôt du côté externe de la veine ophtalmique, où il rencontre une branche nerveuse, venant directement du ganglion de Gasser. Les deux nerfs sont extrêmement voisins; nous pensons que le faisceau nerveux venant du ganglion du trijumeau traverse la capsule du quatrième nerf crânien; cependant, on peut reconnaître très facilement les fibres du pathétique: elles sont nettement distinctes de la

branche venant du ganglion de Gasser et situées en dehors d'elle, mais, par endroits, des fibres semblent passer de l'un à l'autre. Les deux nerfs, pourvus de cellules schwannniennes, continuent côté à côté leur trajet en direction ventrale; nous les suivons sur une vingtaine de coupes, puis, le rameau venu du ganglion de Gasser fait un coude vers l'arrière et se jette dans le nerf ophthalmique, approximativement au niveau où celui-ci reçoit des fibres de l'oculomoteur commun.

Pearson, en 1943, a signalé que le nerf pathétique est plus volumineux au-delà de son croisement avec le trijumeau, que dans la première partie de son trajet, et ce, par suite de l'adjonction de fibres trigéminalles. Dans le cas qui nous intéresse, le quatrième nerf crânien est également plus volumineux dans sa portion terminale, que dans sa portion centrale. Cependant, même en admettant qu'il y a réellement anastomose entre la branche venant du trijumeau et le pathétique, ce n'est pas par adjonction de fibres trigéminalles que le pathétique a augmenté de volume; en effet, le faisceau nerveux qui va se jeter dans le nerf ophthalmique est aussi plus large après avoir longé le quatrième nerf crânien que dans sa portion initiale. Nous devrons donc admettre avec Swennson (1949) que le nerf pathétique renfermant un nombre plus élevé de fibres en périphérie, que dans sa portion centrale, et ne recevant aucune anastomose, ce sont ses fibres qui se ramifient vers la périphérie. Il en serait de même pour la branche venant du ganglion de Gasser.

Le nerf pathétique se termine dans le mésenchyme qui entoure la partie externe du globe oculaire, mais à une certaine distance de l'œil. Comme collatérale, nous avons encore observé à la partie moyenne de son trajet, là où il cotoie le faisceau nerveux venu du ganglion de Gasser, un filet nerveux qui se dirige obliquement en dehors et en bas pour se terminer dans le mésenchyme latéral.

NERF TRIJUMEAU

Le nerf trijumeau sort du rhombencéphale au niveau de la courbure pontique, sous forme d'un tronc nerveux très large mais très court: sa longueur est d'environ 130 microns. Immédiatement s'en dégage un fin filet nerveux qui atteint le nerf facial, peu après son émergence. Le cinquième nerf crânien présente bientôt le ganglion de Gasser, à grand axe transversal, qui est le ganglion le plus volumineux de tout l'embryon. Du bord postérieur du ganglion, se détache, d'abord, la branche maxillaire inférieure; ensuite, du bord antérieur, les branches ophthalmique et maxillaire supérieure. Dans le ganglion, près de son bord postéro-interne, existe un faisceau de fibres nerveuses, bien distinct des cellules ganglionnaires: ce tronc nerveux traverse tout le ganglion, de haut en bas, puis, immédiatement, se jette dans le nerf mandibulaire: il représente sans aucun doute, la racine motrice du nerf trijumeau.

La branche ophthalmique du cinquième nerf crânien se dirige en avant, croise le nerf oculomoteur commun, avec lequel il échange une anastomose; puis, il longe le nerf pathétique.

Le nerf ophtalmique se divise ensuite en deux branches: l'une, qui passe dorsalement, par rapport au pédicule optique, sans doute le nerf nasal; l'autre, le nerf frontal, est plus courte: elle se termine en arrière de l'œil. La branche lacrymale du nerf ophtalmique n'est pas visible.

Le nerf maxillaire supérieur se dirige en bas et en dedans, avant de se partager en minces filets nerveux, qui ont leurs terminaisons dans l'arc maxillaire, dans la région sous-orbitaire.

Le nerf mandibulaire a un trajet oblique en bas et en dedans. Il reçoit une branche du nerf facial, non loin de sa terminaison dans l'arc mandibulaire: il s'agit, vraisemblablement, de la corde du tympan. Un fin rameau se détache du nerf mandibulaire près de son extrémité, et va se terminer dans l'arc mandibulaire, dans le voisinage du nerf pharyngien supérieur: c'est le nerf lingual.

Il y a des cellules de Schwann le long des fibres du nerf trijumeau.

Nous avons encore observé une branche qui quitte le milieu de la face antérieure du ganglion de Gasser (Planche 2, fig. E), se dirige en avant et en bas suivant un trajet légèrement oblique. Elle passe tout contre le côté externe de la veine ophtalmique et va véritablement à la rencontre du nerf pathétique. Elle est bientôt en contact intime avec ce nerf du côté externe. Il semble que quelques fibres passent de l'une à l'autre. Les deux nerfs poursuivent côté à côté leur trajet en direction ventrale. Tous deux sont accompagnés de cellules de Schwann.

Après une vingtaine de coupes, la branche qui vient du ganglion de Gasser se coude vers l'arrière, abandonnant le nerf pathétique. Elle paraît à ce niveau renfermer un plus grand nombre de fibres que dans sa portion initiale; elle n'a pas pris avec elle des fibres du pathétique, celui-ci étant également devenu plus volumineux, et elle n'a reçu aucune anastomose. Faut-il admettre, selon la théorie de Swensson, que les fibres nerveuses se ramifient en périphérie?

Finalement ce faisceau nerveux venu du ganglion du trijumeau se jette dans le nerf ophtalmique.

NERF OCULOMOTEUR EXTERNE

L'émergence du nerf oculomoteur externe se situe à la portion inférieure du rhombencéphale, immédiatement au-dessus de l'émergence du nerf facial. Une lame, ayant été fortement endommagée, nous n'avons pu vérifier si, comme Streeter l'a signalé en 1908, les positions des noyaux des sixième et septième nerfs crâniens sont inversées chez l'embryon, par rapport à ce qu'on voit chez l'adulte.

L'oculomoteur externe se présente comme un gros faisceau de fibres nerveuses, se dirigeant directement en avant et légèrement en dehors, vers le globe oculaire; il passe en dedans de la branche pharyngienne du facial et des nerfs maxillaire et mandibulaire, mais nous n'avons observé aucune anastomose.

Nous avons suivi le sixième nerf crânien ainsi sur une vingtaine de coupes; puis, tout à coup, il se dédouble: les deux branches suivent un trajet parallèle, mais la branche interne reste toujours plus ténue que l'externe; elles se réunissent

à proximité de l'œil. Ce dédoublement n'existe que du côté gauche de l'embryon.

Au stade de 9 mm. l'oculomoteur externe se termine dans le mésenchyme périoculaire, au niveau de la région postérieure de l'œil, un peu en arrière de l'oculomoteur commun: il n'atteint donc pas encore la zone qu'il innervera chez l'adulte.

Nous avons observé des cellules de Schwann accompagnant les fibres nerveuses.

Il ne nous a pas paru évident que le sixième nerf crânien renferme un nombre plus élevé de fibres en périphérie que dans sa portion centrale, comme Swennson l'avait signalé en 1949.

NERF FACIAL

Le nerf facial émerge à la partie antéro-supérieure du bulbe, au-dessus et en dedans du nerf acoustique. Immédiatement après son émergence, il reçoit un fin filet nerveux provenant du nerf trijumeau.

Le septième nerf crânien se dirige ensuite en dehors et en arrière. Il présente bientôt un renflement ganglionnaire: le ganglion géniculé; il a une forme plus ou moins triangulaire; par sa face postéro-interne, il est intimement accolé au ganglion du nerf acoustique, tandis que sa face externe est voisine de la veine cardinale antérieure. Il est formé de grosses cellules arrondies, à noyau volumineux, à nucléoplasme clair, contenant deux ou trois nucléoles: ces cellules sont à un stade de différenciation plus poussé que les cellules du ganglion acoustique. La partie motrice du nerf facial est reconnaissable à ce niveau, bien distincte, de la partie sensitive. Un gros tronc nerveux quitte la portion inférieure du ganglion géniculé, passe entre les branches de division de la veine cardinale antérieure; arrivé ainsi dans le mésenchyme latéral, il se coude brusquement vers le bas; après avoir suivi un certain temps un trajet tout-à-fait vertical, il présente un nouveau coude: cette fois, il se dirige en avant et en dedans, et va s'épuiser dans le mésenchyme de l'arc hyoïdien.

Comme collatérales, mentionnons une branche nerveuse assez importante qui part de la partie inférieure du ganglion géniculé, ventralement par rapport au tronc principal, qui se porte en avant et en dedans, et se termine à la partie antéro-latérale du pharynx.

Un rameau nerveux se détache de la portion verticale du nerf facial, avant son second coude, s'avance en direction ventrale, et légèrement en dedans, pour aller s'anastomoser avec la branche maxillaire inférieure du trijumeau, peu avant sa terminaison dans l'arc mandibulaire: il s'agit, sans aucun doute, de la corde du tympan.

NERF ACOUSTIQUE

Au stade de 9 mm. le huitième nerf crânien est mieux développé que les autres nerfs purement sensoriels.

Le ganglion acoustique est assez volumineux: il est extrêmement voisin, presqu'accollé au nerf facial, par sa face antérieure, tandis que du côté dorsal, il est proche de la vésicule auditive. Les cellules ganglionnaires sont plus petites que celles du ganglion géniculé: leurs noyaux présentent un semis de grains chromatiques au lieu d'un ou deux nucléoles distincts; cette hyperchromaticité se retrouve dans l'épithélium de la placode auditive.

La vésicule auditive, accolée à la face dorsale du ganglion acoustique, a une forme plus ou moins ovoïde, à grand axe dorso-ventral. La partie interne a une paroi plus épaisse (environ 68 microns) que le reste de la vésicule (22 microns). Au pôle dorsal de la vésicule, près du bord interne, nous avons vu le canal endolymphatique, qui peut être suivi sur trente coupes de 7 microns.

A certains endroits, la membrane basale de la vésicule auditive est discontinue: il y a mélange de cellules ganglionnaires et de cellules basales de l'épithélium, à tel point que, par place, on ne peut plus tracer de limite nette entre l'épithélium et le ganglion. Ceci ressemble aux images de migration de cellules épithéliales hors de la vésicule auditive, décrites par Van Campenhout (1935b) chez l'embryon de porc de 3 mm. et suivies par lui jusqu'au stade de 16 mm. De ces observations, on peut conclure à une contribution de cellules placodiques à la constitution du ganglion acoustique.

Le nerf acoustique émerge de l'extrémité proximale du ganglion et pénètre dans le système central juste en dessous et en dehors du nerf facial.

Entre les cellules ganglionnaires, on voit des fibres nerveuses qui se dirigent vers la vésicule auditive. Arrivées contre la face interne de la vésicule, elles se ramifient à la base de l'épithélium. Par endroits, isolément ou sous forme de faisceaux, elles s'insinuent entre les cellules de l'épithélium vésiculaire, jusqu'au niveau de la seconde rangée de cellules.

NERF GLOSSOPHARYNGIEN

Le nerf glossopharyngien se détache du myélencéphale, cranialement par rapport à l'origine du pneumogastrique; il donne immédiatement naissance à un renflement ganglionnaire: le ganglion d'Ehrenritter. Celui-ci est en rapport, par sa face antéro-externe, avec la vésicule auditive, tandis que sa face postérieure est non loin du ganglion jugulaire. De la partie supérieure de ce ganglion et de sa partie moyenne, partent deux branches qui se dirigent dorsalement et latéralement avant de se jeter dans le nerf pneumogastrique.

Redevenu fibrillaire, le nerf glossopharyngien se rapproche de la face interne de la veine jugulaire interne, tout en restant situé ventralement par rapport au nerf pneumogastrique. Après un trajet très court, le neuvième nerf crânien présente un nouveau renflement ganglionnaire, plus volumineux que le premier: c'est le ganglion d'Andersch qui est intimement accolé au ganglion noueux sans que toutefois, des fibres passent de l'un à l'autre.

Le nerf glossopharyngien sort du pôle inférieur du ganglion d'Andersch,

s'infléchit en direction ventrale, passe sur le côté du pharynx et se dissocie dans le troisième arc branchial, non loin de la ligne médiane.

Comme collatérales du neuvième nerf crânien, signalons plusieurs fins rameaux nerveux se terminant au voisinage de l'artère carotide et un filet nerveux venant du ganglion autonomique cervical supérieur. Non loin de l'extrémité du nerf glossopharyngien, se détache une mince branche nerveuse, qui, après un court trajet ascendant en direction médiane, s'épuise le long de la paroi du pharynx: il s'agit de la branche pharyngienne du glossopharyngien.

NERF PNEUMOGASTRIQUE

Le dixième nerf crânien émerge du myélencéphale, caudalement par rapport au point d'origine apparente du nerf glossopharyngien, sous forme de plusieurs faisceaux nerveux parallèles, qui immédiatement se jettent dans un renflement ganglionnaire: le ganglion jugulaire. Celui-ci, par son bord antérieur, est assez proche de la face postéro-inférieure du ganglion d'Ehrenritter. A ce niveau déjà, le nerf pneumogastrique reçoit une petite branche venant du glossopharyngien.

Redevenu purement fibrillaire, il se rapproche du bord interne de la veine jugulaire interne avant d'échanger une seconde anastomose avec le glossopharyngien. Après un court trajet, le nerf pneumogastrique présente un nouveau renflement particulièrement volumineux: c'est le ganglion noueus ou plexiforme, dont le diamètre latéro-latéral est de 225 microns, tandis que le diamètre dans le sens dorso-ventral atteint environ 300 microns. Il est situé directement en dedans de la veine jugulaire interne. Son pôle supérieur voisine le bord postéro-inférieur du ganglion d'Andersch: 20 microns à peine les séparent. Quoique ces deux ganglions soient très étroitement au contact l'un de l'autre, on ne peut affirmer l'existence de connexions entre eux. Une branche nerveuse quitte le ganglion noueus, se dirige vers l'épiblaste latéral et va innérer les muscles superficiels de la région cervicale.

Le nerf spinal se rapproche du ganglion noueus en contournant la veine jugulaire interne, du côté externe; finalement il se fusionnera à la partie latérale externe du nerf pneumogastrique.

Nous avons suivi le ganglion plexiforme, toujours aussi volumineux, sur 112 coupes de 7 microns; sur une partie de son trajet, il coiffe intimement l'extrémité branchiale de la troisième poche ectoblastique, tandis que du côté interne, on trouve le premier ganglion de la chaîne autonomique (Planche 2, fig. G).

Une branche assez importante se détache du pneumogastrique et s'avance vers la ligne médiane: il s'agit du nerf pharyngien supérieur ou laryngé supérieur. Les terminaisons de ce nerf et celles du rameau lingual du trijumeau, dans l'arc mandibulaire, sont extrêmement voisines et il est impossible de nier un passage de fibres de l'un à l'autre.

La branche principale du nerf pneumogastrique quitte le pôle inférieur du ganglion plexiforme et se rapproche de la ligne médiane pour donner naissance avec le nerf du côté opposé à un riche réseau nerveux entourant à la fois la

trachée et l'œsophage. Du plexus péritrachéal partent quelques filets nerveux qui s'épuisent bien vite dans le septum interauriculaire. Le plexus périœsophagien comporte de nombreuses fibres nerveuses et des cellules arrondies à caractère neuroblastique. Ces traînées cellulofibrillaires sont nettement plus abondantes sur les faces droites de l'œsophage et de l'estomac.

L'extrémité du dixième nerf crânien se trouve approximativement à l'union des 3/5 supérieurs et des 2/5 inférieurs de l'estomac.

Les fibres nerveuses du nerf pneumogastrique sont pourvues de cellules de Schwann.

NERF SPINAL

Le nerf spinal naît par plusieurs racines de la face antérieure du bulbe: ces racines s'unissent pour former quatre paquets nerveux, qui suivent un trajet parallèle au-dessus des racines du nerf hypoglosse.

Petit à petit, ces faisceaux se rapprochent, s'accroient de façon à ne plus constituer qu'un seul tronc qui s'avance vers le nerf pneumogastrique, dont il est séparé par la veine jugulaire. Une branche du nerf spinal passe dorsalement par rapport à la veine cardinale antérieure. Le onzième nerf crânien est très voisin du nerf hypoglosse et des fibres nerveuses vont nettement de l'un à l'autre; il y a également des anastomoses bien visibles entre le spinal, l'hypoglosse et les branches du plexus cervical. Le nerf spinal se dirige alors latéralement et ventralement vers le bord postéro-externe du ganglion noueux dans lequel, finalement, il se jette. On peut, cependant, continuer à suivre, plus ou moins, certaines de ses fibres: il semble bien que les plus internes vont avec le pneumogastrique, constituer le nerf pharyngien ou laryngé supérieur, tandis que les plus externes, également incorporées au pneumogastrique, vont innérer le muscle trapèze. Nous avons aussi vu quelques fibres récurrentes du spinal aller innérer les muscles superficiels de la région cervicale en même temps qu'une branche venant du ganglion noueux.

NERF GRAND HYPOGLOSSE

Le douzième nerf crânien naît de la face antérieure du bulbe par plusieurs racines isolées, qui s'unissent pour former cinq racines principales. L'une d'elles montre vers la partie moyenne de son trajet, un groupe de cellules ganglionnaires: c'est ce groupe que Streeter considère comme ganglion précervical et appelle ganglion de Froriep. La racine qui porte ce ganglion, s'épuise petit à petit, tandis que les autres se rapprochent les unes des autres, tout en s'éloignant du système nerveux central; elles constituent rapidement un seul tronc, qui se dirige légèrement en dehors, en restant sous le nerf spinal, puis se dissocie dans la musculature linguale.

Seule, une petite branche persiste: nous avons noté l'accolement très intime de cette branche terminale du nerf grand hypoglosse et du nerf spinal: des fibres passent nettement de l'un à l'autre.

Deux ou trois coupes plus loin, il y a même triple anastomose entre l'hypoglosse, le spinal et le plexus cervical; de cet ensemble, un fin rameau nerveux se détache: il passe du côté interne, d'abord de la veine jugulaire interne, puis du ganglion du pneumogastrique, et enfin il rejoint le nerf glossopharyngien. Le long de ce mince filet nerveux, nous avons remarqué un bouquet de grosses cellules ganglionnaires; des fibres nerveuses s'en détachent et vont se perdre aux environs de la ligne médiane. Ce ganglion, appliqué contre le ganglion du pneumogastrique, et qui a des anastomoses avec les neuvième, onzième et douzième nerfs crâniens et le plexus cervical n'est autre que le ganglion autonomique cervical supérieur (Planche 2, fig. G).

CONCLUSION

Cette étude ne peut être considérée que comme une étape dans une série de travaux sur le système nerveux périphérique crânien.

Cet embryon de 9 mm. est approximativement du même âge que celui qui a fait l'objet d'un travail de Streeter en 1908; cependant, nous trouvons un nerf olfactif bien développé, alors que Streeter n'en fait pas mention. Le même auteur signale les nerfs moteurs et mixtes comme n'ayant à ce stade que peu ou pas d'anastomoses, de collatérales, de terminales; nous avons noté des anastomoses entre l'oculomoteur commun et l'ophtalmique, entre le trijumeau et le facial, entre le glossopharyngien et le pneumogastrique, enfin, entre les nerfs pneumogastrique, spinal et hypoglosse. Nous avons suivi les collatérales des nerfs IV, VII, IX, et X. Nous avons observé les divisions terminales de l'oculomoteur commun, de l'ophtalmique, du mandibulaire.

Notre étude nous a permis de voir des images se rapportant à la formation du corps vitré, qui vérifient la théorie de Mawas. D'autres images, ayant trait au nerf olfactif et au ganglion acoustique confirment les travaux de Van Campenhout. Nous avons également pu constater l'augmentation du nombre de fibres du pathétique dans sa portion terminale, sans qu'il ne reçoive d'anastomose, ce que Swensson avait déjà signalé en 1949.

Si, par contre, nous comparons cet embryon de 9 mm. à celui de 29 mm. décrit par Fagnart, nous voyons le système nerveux périphérique crânien passer du stade d'ébauche à un degré de développement très complexe: le nerf olfactif atteint le système nerveux central, mais il n'est pas encore possible de distinguer les nerfs voméro-nasal, terminal et olfactif, et le bulbe olfactif n'est pas formé. Le troisième nerf crânien n'a que deux branches terminales. Nous n'avons pas vu le récurrent d'Arnold. Le trijumeau est quasi réduit aux trois branches principales; seuls existent déjà les nerfs frontal, nasal, lingual, la corde du tympan, et une anastomose avec l'oculomoteur commun. Il n'y a pas de traces des ganglions ciliaire, otique et sphénopalatin. Nous sommes donc bien loin de la série presque complète des ramifications trigéminalies avec leur contribution aux ganglions annexes que Fagnart décrit chez l'embryon de sept semaines. Le facial ne donne,

au stade de 9 mm., que la corde du tympan, une branche pharyngienne et une anastomose avec le trijumeau.

Les branches terminales, les nerfs pétreux superficiels, les rameaux allant au muscle de l'étrier, au stylo-hyoïdien, au digastrique, le rameau lingual, l'auriculaire postérieur ne sont pas visibles, alors que Fagnart les trouve chez un embryon qui n'est que de trois semaines plus âgé. La vésicule auditive présente un canal endolymphatique, mais le nerf acoustique n'est pas divisé en vestibulaire, sacculaire et ampullaire et nous n'avons pas vu le ganglion de Corti. Comme collatérales, le neuvième nerf crânien a uniquement une branche pharyngienne, deux branches allant au pneumogastrique, quelques rameaux carotidiens et un filet nerveux allant au ganglion cervical. Le nerf de Jacobson, les rameaux du stylohyoïdien, du stylopharyngien, du digastrique n'existent pas encore. A part le nerf pharyngien supérieur, et deux anastomoses avec le glossopharyngien, le nerf pneumogastrique n'a aucune branche importante à la fin du premier mois de vie embryonnaire.

Nous n'avons suivi aucun filet nerveux unissant le pneumogastrique et le ganglion autonomique cervical supérieur. Les onzième et douzième nerfs crâniens sont bien développés et sur une des racines du grand hypoglosse nous avons retrouvé le groupe de cellules ganglionnaires que Streeter appelle ganglion de Froriep.

Comme particularités, chez cet embryon de 9 mm., nous avons noté le dédoublement partiel et unilatéral des nerfs oculomoteur commun et oculomoteur externe; une branche, dont nous ignorons la signification, qui part du ganglion de Gasser, longe le pathétique, échange, semble-t-il quelques anastomoses avec lui, puis se jette dans le nerf ophtalmique; enfin, une anastomose directe entre le trijumeau et le facial, peu après leur émergence du système nerveux central.

SUMMARY

With the help of silver impregnation, an accurate description of the distribution of the cranial nerves of a 9-mm. human embryo is given. The earlier description by Streeter (1908) appears to be incomplete. Numerous anastomoses have been found between the oculomotor and the ophthalmic nerves, between the fifth and the seventh, between the ninth and the tenth, and between the tenth, eleventh, and twelfth nerves. Collateral branches of the various nerves are described. Placodal contributions are found to the olfactory and the acoustic nerves. Cranial autonomic ganglia have not been observed.

Pour toutes les remarques intéressantes, que nous avons pu faire, nous remercions le Professeur Van Campenhout, qui nous a conseillé ce travail et a bien voulu nous aider dans sa réalisation.

TRAVAUX CITÉS

BRACHET, A. (1945). *Traité d'embryologie des vertébrés*. Paris: Masson. pp. 411–79.

DUBREUIL, G. (1947). *Embryologie humaine*. Paris: Vigot. p. 376.

FAGNART, J. (1950). Le système nerveux périphérique crânien d'un embryon humain de 29 mm. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **61**, 151–86.

MAWAS, J., & MAGITOT, A. (1912). Étude sur le développement du corps vitré. *Arch. Anat. micr.* **14**, 41–144.

PEARSON, A. (1938). The spinal accessory nerve in human embryos. *J. comp. Neurol.* **68**, 243–66.

——— (1941a). The development of the nervus terminalis in man. *J. comp. Neurol.* **75**, 39–66.

——— (1941b). The development of the olfactory nerve in man. *J. comp. Neurol.* **75**, 199–217.

——— (1943). The troclear nerve in human fetuses. *J. comp. Neurol.* **78**, 29–43.

——— (1944). The oculomotor nucleus in the human fetus. *J. comp. Neurol.* **80**, 47–63.

——— (1947). The roots of the facial nerve in human embryos and fetuses. *J. comp. Neurol.* **87**, 139–59.

——— (1949). The development and connexions of the mesencephalic root of the fifth nerve. *J. comp. Neurol.* **90**, 1–46.

SEEFELDER, R. (1910). Beiträge zur Histogenese und Histologie der Netzhaut Pigmentzirkels und des Sehnerven. *v. Graefes Arch. Ophthalm.* **73**, 419–517.

STREETER, G. (1908a). The peripheral nervous system in the human embryo at the end of the first month. *Amer. J. Anat.* **8**, 285–303.

——— (1908b). The nuclei of origin of the cranial nerves in the 10 mm. human embryo. *Anat. Rec.* **2**, 111–15.

SWENNSON, A. (1949). Faseranalytische Untersuchungen am Nervus Trochlearis und Nervus Abduncens. *Acta Anat.* **7**, 154–72.

TARKHAN, A. (1950). On the presence of sensory nerve cells on the twelfth nerve. *J. comp. Neurol.* **93**, 219–28.

VAN BUSKIRK, C. (1945). The seventh nerve complex. *J. comp. Neurol.* **82**, 303–33.

VAN CAMPENHOUT, E. (1933). Contribution à l'étude de la formation des nerfs olfactifs. *Trans. roy. Soc. Can.* **5**, 101–2.

——— (1935a). Le système nerveux crânien de l'embryon de porc de 3 mm. *Mémoires roy. Soc. Can.* **5**, 69–72.

——— (1935b). Origine du ganglion acoustique chez le porc. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **46**, 273–86.

——— (1935c). Sur l'origine des ganglions crâniens chez le porc et le poulet. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **118**, 1653–4.

——— (1936a). Origine du nerf olfactif chez le porc. *Arch. Anat. micr.* **32**, 391–407.

——— (1936b). Contribution à l'étude de l'origine des ganglions des nerfs crâniens mixtes chez le porc. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **47**, 585–604.

——— (1945). Le système nerveux viscéral de l'embryon humain de 9 mm. *Bull. Acad. Méd. Belg.* **10**, 391–407.

——— (1949). Les relations nerveuses de la glande interstitielle des glandes génitales chez les mammifères. *Rev. canad. Biol.* **8**, 374–429.

EXPLICATION DES PLANCHES

Toutes les figures sont des microphotographies.

PLANCHE 1

FIG. A. Formation du corps vitré: à la partie inférieure, les cellules du feuillet interne de la rétine dont certaines envoient un prolongement dans l'espace vitré. En haut: le cristallin. (Coloration, méthode de Rogers.)

FIG. B. Émergence du nerf oculomoteur commun. La partie inférieure de la figure montre la paroi du mésencéphale. Au centre, quelques filets nerveux sortent du système nerveux central. Dans la moitié supérieure, cinq groupes de fibres nerveuses de l'oculomoteur commun à direction convergente. (Coloration, trichrome de Masson.)



FIG. A

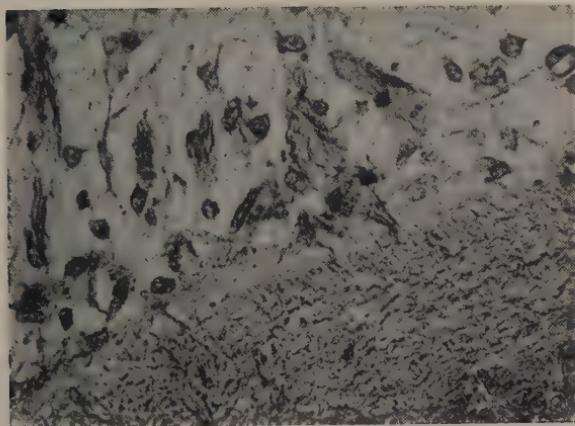


FIG. B

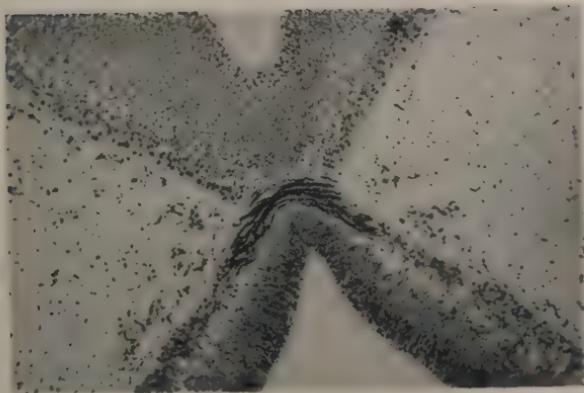


FIG. C
S. MASY
Planche 1



FIG. D



FIG. E



FIG. F



FIG. G

S. MASY

Planche 2

FIG. C. La décussation du quatrième nerf crânien dans le système nerveux central, à la voûte du rhombencéphale. (Coloration, méthode de Rogers.)

PLANCHE 2

FIG. D. Anastomose entre le trijumeau et le facial. En haut et à gauche: la paroi du Rhombencéphale. En haut et à droite: le nerf facial avec en dehors le ganglion acoustique. En bas, au milieu: le ganglion de Gasser et le trijumeau contre le système nerveux central. Au centre de la coupe: le filet nerveux qui va du trijumeau au facial. (Coloration, trichrome de Masson.)

FIG. E. Anastomose entre l'oculomoteur commun et l'ophtalmique. En haut, à gauche: le nerf oculomoteur commun. Dans le quart inférieur droit: le nerf ophtalmique, dont se détache, vers la gauche, un filet nerveux allant à l'oculomoteur commun. Dans le quart supérieur droit: le mésenchyme périoculaire. (Coloration, méthode de Rogers.)

FIG. F. A la partie supérieure de la coupe, le ganglion de Gasser. Une branche nerveuse quitte le ganglion, se dirige vers le nerf pathétique, que l'on voit sous la veine cardinale antérieure. En bas, à gauche, on devine le nerf oculomoteur commun. (Coloration, trichrome de Masson.)

FIG. G. Le ganglion autonomique cervical. Au centre de la figure: le ganglion noueux avec quelques fibres du pneumogastrique et à sa gauche le ganglion autonomique: A la partie inférieure du ganglion autonomique, des fibres nerveuses qui vont se perdre aux environs de la ligne médiane. En haut et au centre: le grand hypoglosse, accolé au spinal qui n'est séparé du ganglion noueux que par la veine jugulaire. À gauche de la veine jugulaire: des filets nerveux allant du XI-XII et du plexus cervical, au ganglion autonomique. En haut, à droite: une branche du pneumogastrique avec quelques fibres du spinal, se dirigeant vers les muscles superficiels. En bas, au centre: quelques fibres nerveuses reliant le ganglion autonomique et le nerf glossopharyngien. À gauche: le pharynx. À droite: la troisième poche ectoblastique. (Coloration, méthode de Rogers.)

(Manuscript received 21:v:54)

The Uptake of Methionine-S³⁵ by the Chick Embryo and its Inhibition by Ethionine

by M. FELDMAN and C. H. WADDINGTON¹

From the Institute of Animal Genetics, Edinburgh University

WITH ONE PLATE

INTRODUCTION

IT seems probable that the synthesis of new proteins must play one of the most fundamental roles in embryonic development. As part of a programme of investigating protein metabolism in morphogenesis (see Waddington & Sirlin, 1954), a study has begun on the incorporation into the early chick embryo of amino-acids labelled with radioactive isotopes and the effect of some of their structural analogues on their metabolism. It seems that for this particular aspect of study the chick embryo has two main advantages over the amphibian: (1) Since it depends for metabolites on external sources (yolk, albumen, culture medium), it is much easier to interfere with the normal pathway of protein synthesis by means of specific antimetabolites. (2) Unlike the amphibian embryo, it does not possess a surface coat, which greatly inhibits the absorption of substances of even small molecular size in amphibian embryos (Friedberg & Eakin, 1949).

The first amino-acid chosen for study was methionine labelled with S³⁵. There are several reasons why this substance seemed likely to be interesting. In the first place, there has been considerable emphasis recently on the importance of —SH groups in differentiation and growth (Rapkine & Brachet, 1951; Brachet, 1944, 1952), and Brachet (1940) has shown that —SH containing proteins are present in the early chick embryo, distributed in a manner which suggests that they are important factors in the epigenetic processes.

The sulphhydryl-containing amino-acids cysteine and homocysteine are easily oxidized, and we preferred methionine rather than cystine for the following reasons: (1) it is an essential amino-acid (for literature: Haurowitz, 1950); (2) it is a precursor of the other sulphur-containing amino-acids (du Vigneaud *et al.*, 1944); (3) it becomes incorporated into the proteins (of rats) to a much greater extent than cystine (Anderson & Mosher, 1951); (4) it was shown (Kemble & Mac-

¹ Authors' addresses: M. Feldman, Department of Zoology, The Hebrew University, Jerusalem, Israel; C. H. Waddington, Institute of Animal Genetics, West Main Road, Edinburgh, U.K.

Pherson, 1954, and others) that ovalbumin contains a considerable amount of it; (5) the ethyl analogue, ethionine, which was found to act as a specific anti-metabolite of methionine, is readily available.

DISTRIBUTION OF THE PROTEIN-INCORPORATED S³⁵

Methods

The differential incorporation of methionine-S³⁵, and its sulphur derivatives into the tissues of the young chick embryo was studied by the autoradiography technique. Fertile eggs were injected before incubation with 0·1 ml. each of DL-methionine-S³⁵ in 0·9 per cent. NaCl, the activity of which was about 50 μ c./ml. The shell was swabbed with 1 per cent. iodine in 95 per cent. alcohol, and a tiny hole was cut in it. The amino-acid solution was injected with a hypodermic syringe (following Francis & Winnick, 1953). It was attempted to inject into the albumen as near as possible to the blastoderm. The puncture was sealed with wax, and the eggs were left at room temperature for 17–18 hours to allow the diffusion of the injected material. The embryos were then incubated for different periods of time, after which they were dissected and rinsed several times in saline before being fixed.

For a general estimation of the incorporation of S³⁵, autoradiographs of whole mounts were prepared. These were fixed on a slide with acetic alcohol, the area opaca was removed, and then the embryo was left to dry on the slide for 2 minutes in order to enable the blastoderm (area pellucida) to stick to the glass. (Any remnants of yolk underneath the area pellucida tend to lift the embryo off the slide while being treated in the various solutions.) The emulsion was then placed above the blastoderm. For detailed study autoradiographs of sectioned specimens were prepared. The embryos were fixed either in acetic alcohol or in 10 per cent. trichloracetic acid, sectioned at 6 μ and autoradiographed according to the stripping-film method of Doniach & Pelc (1950).

The whole embryos were exposed for 2–5 days and the series of sections for 5–7 days. The sections were stained after development and fixation in Mayer haemalum for 2–3 minutes (without differentiation), in order to avoid counting of grains in regions in which the density of cells was lower than normal.

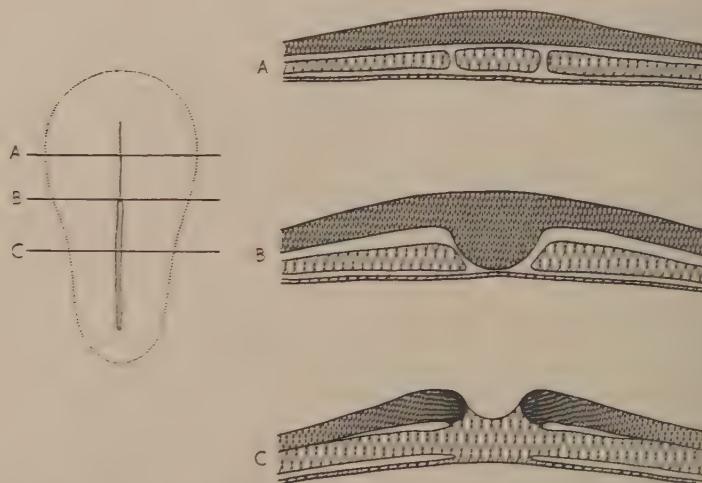
The stages which are referred to are according to the classification of Hamburger & Hamilton (1951).

Observations

Autoradiographs prepared from whole mounts of blastoderms present a picture which is similar to, but not quite identical with, that resulting when embryos are stained with a conventional histological stain such as haematoxylin. The main features stand out clearly, but the interpretation of this is not simple, since the darkness of the primitive streak or neural tube, for instance, will be caused not only by its intrinsic activity per unit mass but also by the thickness of the blastoderm at that point. Thus the evidence of whole-mount autoradiographs

needs to be checked against the data from sectioned embryos, in which the thickness of the material under examination is constant.

The main points which require notice about the whole-mount autoradiographs concern the primitive streak. In the stage of the fully grown streak (stage 5) there is a more intense darkening around the node than seems easy to account for in terms of the thickness of the region, and this can probably be accepted as evidence for greater activity per unit mass of this area (Plate, fig. A). Again, the bottom of the primitive groove is paler than its thickness would suggest; we shall see later that sections definitely show that activity is low in the centre of the streak. Several authors (references in Waddington, 1952, chap. vii) have described antero-posterior gradients of various substances along the streak, and Jacobson (1938) and Spratt (1952) have found that with certain methods of staining it is possible to make visible the presumptive neural plate area in this stage. The autoradiographs do not show either of these phenomena with any clarity; one may conclude that there is no very strong antero-posterior gradient in activity, nor any great difference in the presumptive neural tissue of this stage, but the possibility of slight effects of this kind is not excluded.



TEXT-FIG. 1. Diagrams of cross-sections at three levels through a head process embryo: the shading indicates the darkening of the autoradiographs.

In sections of primitive streak or head process stages (4, 5) the uptake of the ectoderm was found to be remarkably higher than that of the mesoderm (Text-fig. 1). In the primitive streak region the primitive ridges show the maximal concentration, which decreases gradually towards the lateral edges of the ectoderm, while in the medial direction it shows a much sharper fall from the zone of its highest activity towards the primitive groove. The relatively low activity of

the floor of the groove is similar in these stages (but not in later ones) to that of the invaginated mesoderm. The anterior part of the primitive streak, Hensen's node, shows a high concentration throughout its whole cross-section. However, the cells of the head process (notochord), which are derived from this region, are similar to the other mesodermal cells in their low activity. It therefore appears as if the cells of the presumptive notochord rapidly lose their 'original' concentration as soon as they start the migration forwards from Hensen's node. Thus it is not surprising that there is no postero-anterior gradient in the head process of these early stages (Plate, figs. B, C, D).

In the following stages (head-fold to first somite, stages 7, 8) the primitive streak is similar in its uptake to that of the earlier ones. Table 1 presents counts which were obtained from successive areas in the ectodermal and mesodermal components of Hensen's node arranged in the medio-lateral order and marked A, B, C, D. In both the ectodermal and the mesodermal layers it is shown that $A > B > C \geq D$. Although we cannot yet define quantitatively the difference between the ectodermal and the mesodermal medio-lateral gradients, preliminary observations suggest that the slope of the mesodermal gradient in the immediate neighbourhood of the streak is steeper than that of the ectodermal one. The existence of antero-posterior gradients in these stages is under investigation.

	A	B	C	D
Ectoderm	50.9 ± 1.6 (21)	40.6 ± 2.0 (20)	34.1 ± 1.3 (18)	30.5 ± 1.9 (15)
Mesoderm	47.0 ± 1.7 (18)	35.6 ± 1.8 (17)	30.1 ± 1.6 (16)	33.0 ± 1.0 (15)

TABLE 1. Counts of grains in areas of $64\mu^2$ in cross-section of Hensen's node, stages 7, 8.
(The figures in brackets are the numbers of areas counted.)

With the onset of neurulation, various changes take place in the uptake of the S^{35} by the embryonic tissues. The neural tissue shows from the beginning of the process the maximal incorporation of the isotope. In stages 8, 9 significant differences were found between the anterior part of the nervous system and its posterior part; the former being higher in its concentration than the latter (Table 3). The highest concentration in this tissue in stage 9 seems to be located in the brain.

Within the neural fold, in cross-section, a steep dorso-ventral gradient is observed. The highest uptake is confined to the upper part of the fold and it decreases towards the deeper ventral parts of the tissue (Plate, fig. E).

While in earlier stages the ectoderm did not differ in its S^{35} incorporation from the 'presumptive neural plate', in stages 8 and 9 its activity is significantly lower than that of the neural tissue.

In Table 2 counts are given from two cross levels of an embryo in stage 8. In the neural tissue the concentration is significantly higher than that of the ectoderm and mesoderm. In the anterior part of the embryo the ectoderm is more

active than the mesoderm, while in the region of the first somite the counts of the mesoderm are higher than in the anterior part and are similar to those of the ectoderm. The anterior mesoderm counted here is destined to become head

	neural-fold	ectoderm	mesoderm
A	54.1±1.7 (30)	43.6±1.8 (25)	36.0±1.5 (24)
B	54.2±1.4 (30)	40.4±1.6 (25)	40.4±1.0 (31)

TABLE 2. Counts of grains in areas of $64\mu^2$ in several contiguous sections at two levels (A, B) of stage 8. (The figures in brackets are the numbers of areas counted.)

mesenchyme, which is a more loosely aggregated tissue than somitic mesoderm, but in this stage the difference is not marked; and the staining of the sections made it possible to pick areas for counting in which the tissues seemed to be of similar density. It is therefore believed that the difference between the anterior and the more posterior mesoderm is a real one. We shall see that in a slightly later stage the activity of the somite mesoderm is undoubtedly high (Table 3).

	neural-fold	chorda	axial mesoderm	ectoderm	lateral mesoderm	endoderm
A	44.0±1.2 (43)					34.5±1.5 (31)
B	43.5±1.7 (21)	34.8±1.0 (20)	36.1±1.8 (22)	29.9±0.9 (20)	31.8±1.2 (20)	
C	37.4±1.4 (22)	34.8±1.3 (21)	27.4±1.3 (19)	27.0±1.3 (19)	30.8±1.4 (19)	

TABLE 3. Counts of grains in areas of $64\mu^2$ in several contiguous sections at three levels (A, B, C) of stage 8-9. (The figures in brackets are the numbers of areas counted.)

Table 3 is of a later stage (8-9). Here again the neural tissue shows a higher uptake than the other tissues. In the two anterior sections this tissue is shown to have a higher activity than in the posterior one. Along the notochord no differences were found, in accordance with the situation in the head process of younger stages. Its uptake does not differ significantly from that of the mesoderm. The somites (cross-section B) were probably somewhat more active than either the lateral mesoderm of the same level or the axial mesoderm of a posterior region, in which the segmentation has not yet started. In this posterior region, prior to the formation of the somites, no significant differences appear between the axial and lateral components of this tissue.

The mesoderm in general seems to be more active in the region of the neural groove than the ectoderm, unlike the situation in younger stages.

Counts of the endoderm are given only from the foregut, since underneath most of the embryo this layer is so thin that even in parts in which it covers the units of the microscope graticule the effect of cross-radiation is so reduced that a reliable count is impossible.

EFFECT OF ETHIONINE ON THE UPTAKE OF METHIONINE-S³⁵

In order to study the effect of specific antimetabolites of methionine on the incorporation of the latter into the tissues of the chick embryo, the ethyl-analogue of this amino-acid, DL. ethionine, was applied. Experiments were carried out in which eggs were injected either with methionine-S³⁵ (group M) or with the same activity of methionine-S³⁵ plus ethionine (group ME), and the activity of the protein extracts was measured in a Geiger-Müller counter. In group M, eggs were injected each with 1.7 μ c. of DL. methionine-S³⁵ in 0.35 ml. of saline. In group ME, eggs were injected each with 1.75 μ c. of methionine-S³⁵ plus 3.9×10^{-6} M. DL. ethionine in 0.35 ml. of saline. The ratio in molar concentrations of methionine/ethionine was 1/420.

In this series 4 pairs of experiments were carried out. In each experiment 24 eggs were injected with methionine and 24 with methionine plus ethionine. After allowing time for diffusion at room temperature, the eggs were incubated at 37.5° C. The embryos were fixed in 10 per cent. trichloracetic acid, and homogenized in a ten-Broek homogenizer tube in groups which contained 15–18 specimens. The proteins were extracted according to Friedberg & Eakin (1949). The homogenates were centrifuged once in 10 per cent. trichloracetic acid, three times in 5 per cent. trichloracetic acid, and twice in acetone. The extracts were dried in air on the planchets of the counter. In order to avoid self-absorption it was attempted to put on each planchet not more than 1 mg. of proteins (usually about 0.5 mg.). The figures obtained in this series of experiments are given in Table 4.

TABLE 4

Specific activity of the protein fraction of embryos following injection of methionine or methionine plus ethionine.
Counts/minute/mg. protein

Time of incubation in hours	Methionine	Methionine and Ethionine	$\frac{M+E}{M} \times 100$
31	450.5	189.5	42.06
40	336.3	145.9	43.38
42	295.0	136.0	46.10
52	313.0	147.5	47.76

No conclusions can be drawn from this experiment about the specific uptake of methionine in different stages, since each group contained a range of stages

and the variation of the developmental ages differed in the different groups. However, the main point, that is the inhibition of the uptake of methionine by its analogue, is clearly demonstrated. At the ratio of the two amino-acids employed, the ethionine has reduced the uptake of methionine-S³⁵ to about 45 per cent.

MORPHOGENETIC EFFECTS OF ETHIONINE

In view of the inhibitory effect of ethionine on the uptake of the injected methionine-S³⁵, it seemed likely that, by increasing the dosage of the antimetabolite, one might succeed in inhibiting the natural incorporation of methionine into the proteins of the developing embryo. The synthesis of those proteins in which the methionine is an essential factor might thus be blocked; and this might have an effect on the morphogenesis of the embryo.

In the first series of experiments eggs were injected with 6.7×10^{-6} M. ethionine in saline before incubation. Controls were injected with 6.7×10^{-6} M. methionine. The eggs were left for 18 hours and then incubated for 42 hours. The embryos were then dissected and the stages classified. Embryos which contained a head fold, but did not show any sign of the first pair of somites, were classified as stage 6, although some of them showed a beginning of neurulation which was similar to Hamburger's stage 7.

The results obtained from this series are given in the upper two rows of Table 5.

TABLE 5

Percentages of embryos at different stages after incubation for 42 hours

Stages	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total No. of embryos
Injected with 6.7×10^{-6} M ethionine	5.1	29.7	11.0	20.4	6.0	7.6	12.7	4.2	3.3	—	—	118
Injected with 6.7×10^{-6} M methionine	—	—	4.7	7.8	6.3	18.7	18.7	32.8	9.4	1.6	—	64
Injected with 1.7×10^{-6} M methionine and 6.7×10^{-6} M ethionine	—	6.7	4.4	4.4	2.2	8.9	13.6	31.0	17.8	4.4	4.4	45

Of the embryos injected with ethionine the largest number reached only stage 4, i.e. the long primitive streak stage, while another 31.4 per cent. carried on developing the notochord, but stopped at the beginning of neurulation. The controls (injected with methionine) seem to develop rather normally. In addition to the retardation in the development of the ethionine-treated embryos, a number of abnormalities were found. Although the study of these malformations has not yet been completed, it seems to be worth while pointing out that they may

be divided into two groups: (1) an irregular overgrowth of Hensen's node, (2) abnormal neurulation confined to the anterior part of the neural tissue. The first type of abnormality was found mainly among those embryos which reached only stage 4. Out of 35 embryos found in this stage, 6 showed clearly the overgrowth of the node, while only 1 with a malformed node formed a notochord and started neurulation (which was, however, abnormal). The neural abnormalities appeared in two forms:

1. Those of stages 6, 7 in which a neural plate developed in the anterior part of the embryo and has started to 'neurulate' as an isolated entity, without the usual gradual continuance in the caudal direction. From 31 embryos of these stages, 7 were affected in this way.
2. Four embryos, of the 20 which reached stages 9 and 10, showed a reduced brain, which appeared as narrow as the neural tube. The stages in these cases were defined according to the number of somites.

Another series of experiments was carried out with the purpose of studying the sensitivity of different stages, or of various morphogenetic processes, towards this antimetabolite. In one experiment eggs were incubated for 25 hours, then injected with 6.7×10^{-6} M. ethionine in 0.5 ml. saline. They were left at room temperature for 18 hours, then reincubated for 32 hours. The controls were uninjected embryos. The results, in Table 6, show that the development of the treated embryos was retarded, the embryos being held back among the various stages of neurulation. The general morphology of the somites, blood-vessels, and heart were quite normal, but the neural tissue was again found to be affected in

TABLE 6

*Percentages of embryos at different stages. Incubated for 25 hours,
injected and reincubated for 32 hours*

Stages	6	7	8	9	10	11	12	13	Total No. of embryos
Controls	—	7.1	—	—	—	21.4	14.3	57.2	14
Injected with 6.7×10^{-6} M. ethionine.	3.7	16.7	16.7	22.2	22.2	9.3	1.8	7.4	54

a number of embryos. Of 9 embryos which reached stage 7, 5 showed an abnormal beginning of neurulation. Of 9 in stage 9, 3 had a complete set of 7-8 somites and a normal neural tube, but the brain appeared as a wide-swollen neural plate, of an irregular shape. Another 3 embryos of stages 8, 9 had a narrow brain similar to that described in the previous experiment.

In another series eggs were injected after 44 hours of incubation each with 6.7×10^{-6} M. of ethionine. Controls were injected with equimolar quantities of methionine. They were left at room temperature for 18 hours, then reincubated for 24 hours. The controls developed normally and reached stages 16-17, while the ethionine-treated were retarded by about 1-2 stages, but did not show any abnormalities.

A similar experiment was carried out in which the eggs were reincubated immediately after the injection, without allowing time for diffusion. In this case it was found that in many embryos the head was retarded to a much greater extent than the trunk region. These embryos therefore could not be defined in terms of stages. This apparent differential sensitivity of organs to the antimetabolite is under current investigation.

Before concluding that the effects caused by ethionine are due to competitive inhibition of the normal amino-acid by its structural analogue, two possibilities had to be checked: (1) whether methionine can alleviate the effects of ethionine; (2) whether other natural amino-acids (the uptake of which is, probably, also inhibited by the ethionine) can carry out this alleviation.

With regard to the first question, the following experiment was made. Eggs were injected with 6.7×10^{-6} M. ethionine plus 1.7×10^{-6} M. methionine in 0.5 ml. saline, left for diffusion, and incubated for 42 hours. The results, summarized in the last row of Table 5, show that at least as far as the stages of development are concerned the retardation was abolished completely. The stages reached do not differ appreciably from those attained by the controls injected with methionine alone. However, it should be pointed out that 6 embryos (out of 45) showed various signs of abnormal differentiation of the brain.

As to the second question, of whether other amino-acids will alleviate the effect of ethionine, a similar experiment was carried out with glycine. Eggs were injected with 6.7×10^{-6} M. of ethionine plus equimolar concentration of DL. glycine in 0.5 ml. of saline. Controls were injected with 13.4×10^{-6} M. of DL. glycine in 0.5 ml. of saline. The results, shown in Table 7, indicate that the glycine did not abolish the retardation of chick morphogenesis caused by ethionine.

TABLE 7

Percentages of embryos at different stages after incubation for 42 hours

Stages	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total No. of embryos
Injected with 6.7×10^{-6} M. glycine and 6.7×10^{-6} M. ethionine	2.4	41.5	14.6	9.8	2.4	4.9	14.6	14.6	7.3	--	2.4	41
Injected with 13.4×10^{-6} M. glycine	--	--	--	6.6	--	6.6	33.3	40.0	13.3	--	--	15

DISCUSSION

The pattern of the S^{35} distribution in the tissues of the chick, which was obtained by the autoradiography technique, is actually a heterogeneous picture. Although we may suppose that free amino-acids and small peptides (like glutathione) were removed by our procedure, the incorporation of the S^{35} into the

tissue-proteins might have been in any of the different sulphur-containing amino-acids. Accordingly the proteins in which the S³⁵ is incorporated may vary within and between the embryonic tissues. Further experiments, in which protein hydrolysates from the different tissues are analysed into their amino-acid components, will have to clear up this point.

However, in spite of this expected heterogeneity, the general distribution of the methionine and its possible derivatives seems to be correlated with some of the morphogenetic processes. It was shown that the various tissues differ specifically in their S³⁵ uptake. This variation changes during differentiation. The neural tissue was always found to show the highest activity. The mesoderm, lower than the ectoderm in the younger stages, tends to increase its uptake particularly during the formation of the somites. In the primitive streak the primitive groove is less active than the primitive ridges. In the neural tissue the anterior part was more active than the posterior. A dorso-ventral gradient seems to exist within the neural fold.

The fact that Hensen's node and the walls of the primitive streak show a high activity, and that this falls rapidly in the cells which are invaginated at these places, requires some consideration. From these invaginated cells new types of tissue will be produced; mesoderm from the primitive streak and notochord from Hensen's node. It might be expected that the characteristic proteins, specific to these tissues, would begin to be synthesized immediately after the invagination. Instead it is found that the maximum incorporation takes place immediately before the invagination. It seems likely then that in these regions the activity noticed is not connected with the synthesis of tissue-specific proteins but rather has something to do with the metabolic processes which bring about the invagination; perhaps it is a symptom of some energy-delivering mechanism. On the other hand, it is possible that the incorporation is a sign of the formation of a protein which is concerned with initiating the synthesis of tissue-specific proteins but not with the continuance of their production.

The concentration of the S³⁵ in the primitive streak is similar to that of P³² according to Hunt & Wolken (1948). Their autoradiographic technique of whole embryos, taken from Smith & Gray (1948), was based on the latter's assumption that the chick embryo 'varies little in thickness along its length', a statement which we can hardly confirm. However, they found that the incorporation of P³² in the primitive ridges was similar to that of the primitive groove, unlike our observation with S³⁵.

During neurulation the nervous system was found to increase its uptake of S³⁵. Although the anterior part of this tissue was found, in stages 8–9, to be more active than the posterior, this may be merely the result, rather than the cause, of the well-known antero-posterior gradient in stage of development. In the chick, where such a gradient is well developed from the long primitive streak stage onwards, it is extremely difficult to assess the causal significance of any particular expression of the gradient.

The uptake of the upper parts of the neural fold was shown to be higher than that of the lower ones, and it seems that a dorso-ventral gradient exists here. The morphogenetic significance of this phenomenon is being studied at present by examining the effect of ethionine on the pattern of S^{35} distribution in the neural tissue, particularly in the abnormal embryos. A relation with the production of neural crest seems a possibility.

The mesoderm was found to increase its activity during the formation of the somites. In stages 9, 10 the centre of a somite does not differ in its S^{35} concentration from the neural tissue of the same cross-section. It is not yet clear whether this concentration is correlated with intensive mitotic activity, thus being a result of a higher growth rate of this tissue. Alternatively the higher uptake might be connected with processes of differentiation of the somites, i.e. with the formation of new proteins which might take place here.

Ethionine was shown to inhibit the uptake of methionine- S^{35} in the chick embryo by as much as 60 per cent. This result is in accordance with those of Simpson *et al.* (1950) for rat proteins and Francis & Winnick (1953) for protein of heart fibroblasts. The ratio of methionine to ethionine used (1 : 420) does not express quantitatively the efficiency of ethionine in this competitive inhibition, for two reasons: (1) both amino-acids were given at the same time and there may be differences in their rates of uptake, which would affect the ratio of substances actually available; (2) the injected methionine- S^{35} is diluted by the natural methionine which is already present in the egg. Although it was assumed that no free methionine exists in the yolk (Needham, 1950), this amino-acid was shown recently to be liberated from the yolk proteins, and to increase by progressive proteolysis during the first 9 days of incubation (Williams *et al.*, 1954).

Ethionine has been found to affect many biological systems: Harris & Kohn (1941) showed that it inhibits the growth of micro-organisms. Dyer (1938) and Stekol & Weiss (1949) inhibited with ethionine the growth of mice and rats. Jensen *et al.* (1951) described fatty infiltration of the liver, and Goldberg *et al.* (1950) the destruction of the acinar tissue of the pancreas by the amino-acid. In all these cases the effects were alleviated by methionine.

In our experiment it was shown that ethionine retarded the early chick morphogenesis. The chemical specificity of this effect was confirmed by the fact that methionine abolished the effects of ethionine. The proportion of methionine required for this counteraction seems to vary according to the biological system involved. Harris & Kohn (1941) prevented the effects of ethionine on growth rate of *Escherichia coli* with a $\frac{1}{10}$ th concentration of methionine. Stekol & Weiss (1949) used, for mice, equimolar quantities of methionine, without alleviating completely the effect of ethionine. In our experiments $\frac{1}{2}$ -molar concentration of methionine was sufficient to antagonize the general retardation of development, although some abnormalities were still obtained. Glycine, the uptake of which was found by Simpson *et al.* (1950) to be also inhibited by ethionine in rats, did

not alleviate the effect of ethionine in chick embryos. It seems therefore that we are dealing here with a specific competitive-inhibition of methionine.

The variation in the stages reached by the embryos in the experiments with ethionine-retardation is probably the result of variation in the concentration of antimetabolite to which they were subjected. Although they were all injected with the same dosage, it appears that 18 hours are not sufficient for a complete diffusion of the material; therefore those injected nearer to the embryo would be the more affected. It is hoped now to reach standardization of these conditions by treating embryos *in vitro*.

This variability of the stages obtained in each experiment makes it difficult to answer the question of whether some particular morphogenetic processes are more sensitive than others to the effect of ethionine. However, a careful comparison of the results of the different experiments provides some indirect evidence of the existence of differential sensitivity of the various stages. In the first experiment, in which eggs were injected before incubation, it was shown that most of the effected embryos reached stage 4, i.e. a stage which is usually attained after 18–19 hours (in our incubator 20–24 hours) of incubation. In the second experiment, in which eggs were injected after 25 hours of incubation, stages 7, 8 were the earliest ones, and these should have been reached by, at the most, 6–7 hours after the injection. Some eggs of the first experiments which were opened after 20–24 hours of incubation did not seem to differ from the controls. Thus the inhibition in the second experiment seemed to be more severe than in the first. On the other hand, eggs injected after 44 hours of incubation were only slightly affected. It may therefore be assumed that the sensitivity is highest during the late streak stage and neurulation.

The abnormalities obtained by ethionine were more or less confined either to Hensen's node or to the anterior part of the neural tissue. This may indicate that the morphogenetic processes located in these areas are preferentially affected. Even in those experiments in which eggs were injected after 44 hours of incubation, but reincubated immediately after the injection, the embryos showed a retardation of the development of the head. Experiments now in progress with other antimetabolites of methionine (Norleucine, Methoxinine) are expected to contribute more data to this question. Herrmann (1953) reports in brief phenomena of selective sensitivity of the developmental processes in the chick to analogues of *iso*-leucine, leucine, valine, and phenylalanine. But since he has not checked the chemical specificity of these effects and his experiments have been carried out *in vitro*, it is difficult to compare his results with ours. Recently Rothfels (1954) obtained with some other amino-acid analogues results which are similar to those of Herrmann.

The specificity of the morphogenetic processes affected by antimetabolites of amino-acids raises interesting questions from the general biochemical as well as from the embryological points of view. Simpson *et al.* (1950) and Levine & Tarver (1951) have shown that ethionine interferes with the *de novo* synthesis

of proteins by being incorporated into them, and thus forming 'abnormal proteins'. Now, if ethionine should be found to affect specifically particular morphogenetic centres, one will have to conclude that, in these places, there are proteins which are affected by ethionine to a greater extent than other types of proteins, which are located outside these areas. We might be able to trace, in this way, the role in developmental processes of particular proteins in the synthesis of which methionine, or its sulphur derivatives, is an essential factor.

Rapkine & Brachet (1951) and Lallier (1951) have suggested the importance of —SH groups in neural induction. The application of ethionine may be found to be a good tool for this question too. Simpson *et al.* (1950) have shown that ethionine inhibits the conversion of methionine to cystine even more than its incorporation into the proteins. The possibility of a similar inhibition in the chick embryo, and of the inhibition of the formation of —SH carriers in the embryo's proteins, are now under investigation.

SUMMARY

1. The distribution of S³⁵ in the proteins of the chick embryo was studied with labelled methionine.
2. The various tissues were found to differ significantly from each other in their incorporated S³⁵.
3. Ethionine inhibited the uptake of methionine and higher dosages of ethionine retarded differentiation, and caused abnormalities.
4. Methionine was shown to alleviate the effect of ethionine. Glycine did not.
5. The specificity of the morphogenetic processes affected by ethionine, and the biochemical aspects of this inhibition, are briefly discussed.

ACKNOWLEDGEMENTS

One of us (M. F.) would like to make grateful acknowledgement of a British Council scholarship. We wish also to express our thanks to Dr. J. Dainty and Miss H. Yates for technical assistance. Financial support was also received from the Agricultural Research Council.

REFERENCES

ANDERSON, E. I., & MOSHER, W. A. (1951). Incorporation of S³⁵ from DL-cystine into glutathione and protein in the rat. *J. biol. Chem.* **188**, 717-22.
BRACHET, J. (1940). Étude histochimique des protéines au cours du développement embryonnaire des poissons, des amphibiens et des oiseaux. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **51**, 167-202.
— (1944). *Embryologie chimique*. Paris: Masson.
— (1952). *Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon*. Paris: Masson.
DONIACH, L., & PELC, S. R. (1950). Autoradiography technique. *Brit. J. Radiol.* **23**, 189-92.

DU VIGNEAUD, V., KILMER, G. W., RACHELE, J. R., & COHN, N. (1944). On the mechanism of the conversion *in vivo* of methionine to cystine. *J. biol. Chem.* **155**, 645-51.

DYER, H. M. (1938). Evidence of the physiological specificity of methionine in regard to the methylthiol group: the synthesis of s-ethylhomocysteine (ethionine) and a study of its availability for growth. *J. biol. Chem.* **124**, 519-24.

FRANCIS, D., & WINNICK, T. (1953). Studies on the pathway of protein synthesis in tissue culture. *J. biol. Chem.* **202**, 273-89.

FRIEDBERG, F., & EAKIN, R. M. (1949). Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. I. Uptake of radioactive glycine. *J. exp. Zool.* **110**, 33-46.

GOLDBERG, R. C., CHAIKOFF, I. L., & DODGE, A. H. (1950). Destruction of the pancreatic acinar tissue by DL ethionine. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **74**, 869-72.

HAMBURGER, V., & HAMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 59-92.

HARRIS, J. S., & KOHN, H. J. (1941). On the mode of action of the sulfonamides: II. The specific antagonism between methionine and the sulfonamides in *Escherichia coli*. *J. Pharm. exp. Therap.* **73**, 383-400.

HAUROWITZ, F. (1950). *Chemistry and biology of proteins*. New York: Academic Press.

HERRMANN, H. (1953). Interference of amino-acid analogues with normal embryonic development. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 291-5.

HUNT, E. L., & WOLKEN, J. J. (1948). The distribution of phosphorus S^{35} in early chick morphogenesis. *J. exp. Zool.* **109**, 109-18.

JACOBSON, W. (1938). The early development of the avian embryo. II. Mesoderm formation and the distribution of presumptive embryonic material. *J. Morph.* **62**, 445-501.

JENSEN, D., CHAIKOFF, I. L., & TRAVER, H. (1951). The ethionine induced fatty liver: dosage, prevention and structural specificity. *J. biol. Chem.* **192**, 395-403.

KEMBLE, A. R., & MACPHERSON, H. T. (1954). Determination of monoamino monocarboxylic acids by quantitative paper chromatography. *Biochem. J.* **54**, 548-55.

LALLIER, R. (1951). Recherches sur le rôle des groupes sulphidriques dans la morphogenèse. II. Effet de quelques agents oxydants et réducteurs sur le développement d'explants dorsaux et ventraux de jeunes gastrulae d'amphibiens. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris*, **33**, 439-46.

LEVINE, M., & TARVER, H. (1951). Studies on ethionine. III. Incorporation of ethionine into rat proteins. *J. biol. Chem.* **192**, 835-50.

NEEDHAM, J. (1950). *Biochemistry and morphogenesis*. Cambridge: University Press.

RAPKINE, L., & BRACHET, J. (1951). Recherches sur le rôle des groupes sulphydrylés dans la morphogenèse. I. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris*, **33**, 427-38.

ROTHFELS, U. (1954). The effects of some amino-acid analogues on the development of the chick embryo *in vitro*. *J. exp. Zool.* **125**, 17-37.

SIMPSON, M. V., FARBER, E., & TARVER, H. (1950). Studies on ethionine. I. Inhibition of protein synthesis in intact animals. *J. biol. Chem.* **182**, 81-89.

SMITH, E. E., & GRAY, P. (1948). The distribution of copper 64 in early embryo chick. *J. exp. Zool.* **107**, 183-206.

SPRATT, N. T. (1952). Localization of the prospective neural plate in the early chick blastoderm. *J. exp. Zool.* **120**, 109-30.

STEKOL, J. A., & WEISS, K. F. (1949). A study of growth inhibition by D, L, and DL ethionine in the rat and its alleviation by the sulfur-containing amino-acids and choline. *J. biol. Chem.* **179**, 1049-56.

WADDINGTON, C. H. (1952). *The Epigenetics of Birds*. Cambridge: University Press.

— & SIRLIN, J. L. (1954). The incorporation of labelled amino-acids into amphibian embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **2**, 340-7.

WILLIAMS, M. A., DACOSTA, W. A., NEWMAN, L. H., & MARSHALL, L. M. (1954). Free amino-acids in the yolk during the development of the chick. *Nature, Lond.* **173**, 490.

EXPLANATION OF PLATE

FIG. A. Autoradiograph of whole mount (unstained) of embryo of stage 6.

FIGS. B, C, D. Autoradiographs of three sections through the streak (Fig. B), the node (Fig. C), and the head process (Fig. D) of an embryo of stage 5. Compare with the diagrams of Text-fig. 1.

FIG. E. Autoradiograph of section of neural groove in cephalic region of embryo of stage 9, showing dorso-ventral gradient in the neural tissue.

(*Manuscript received 19:vi:54*)



A



B



C



D



E

M. FELDMAN & C. H. WADDINGTON

Plate I

Contribution expérimentale à l'étude de la formation de l'endoblaste chez les Oiseaux

par HUBERT LUTZ¹

Laboratoire de Zoologie générale et appliquée de la Faculté des Sciences de Clermont-Ferrand

AVEC TROIS PLANCHES

POSITION DU PROBLÈME

EN 1884 M. Duval écrivait dans son mémoire *De la formation du blastoderme dans l'œuf d'Oiseau*: 'Si les travaux relatifs à la segmentation sont peu nombreux, tous concordent entre eux dans leurs résultats généraux; par contre, ceux relatifs à la formation des feuillets blastodermiques dans les premières heures de l'incubation sont presque innombrables et aboutissent aux conclusions les plus opposées quant aux rapports d'origine du feuillet interne avec le feuillet externe.' La situation n'a pas changé depuis lors.

M. Duval (1884), Patterson (1909) observent que le blastodisque repose directement sur le vitellus. Au cours du développement, le blastoderme diminue d'épaisseur; la couche superficielle s'agence en une structure épithéliale. En même temps le blastodisque se sépare du vitellus; il constitue, dans la région postérieure un bord d'enroulement autour duquel les cellules superficielles s'invaginent pour former le deuxième feuillet embryonnaire, qui progresse de l'arrière vers l'avant pour atteindre en 4 heures la limite antérieure de la cavité sous-germinale. D'après Patterson, des marques de charbon, faites près du bord postérieur du blastoderme, peuvent être transportées sous le blastoderme pendant le développement ultérieur.

Pour Gräper (1929), Mehrbach (1935), Pasteels (1937), le blastodisque non incubé de Poule a un aspect chagriné dû à de nombreux plissemens; ces sillons constitueraient un blastopore diffus par lequel s'invaginent les cellules endoblastiques. D'ailleurs, ces auteurs observent, au niveau du feuillet externe, un grand nombre de mitoses et pourtant le blastoderme n'augmente pas de taille. Ils en concluent qu'une partie de ce matériel passe en profondeur pour constituer l'endoblaste.

Au contraire, pour Kionka (1894), Peter (1938), et pour Pasteels (1945) revenant sur une opinion antérieure, la formation du feuillet endoblastique est

¹ Author's address: Laboratoire de Zoologie générale et appliquée, 1, Avenue Vercingétorix, Clermont-Ferrand, France.

due à une délamination. En effet, le blastoderme, pris au moment de la ponte, est d'abord formé par 3 ou 4 assises cellulaires. Par la suite, on voit se former de petits espaces intercellulaires qui confluent, et finalement séparent le feuillet superficiel du feuillet profond. Et Peter, parlant de la théorie de Patterson dit notamment: 'Sie ist zu verwerfen, und soll aus dem Schriftum verschwinden' (1938, p. 447); Spratt (1946) partage une même opinion.

Jacobson (1938) croit que l'endoblaste extra-embryonnaire (yolk endoderm) se forme par délamination — mais l'endoblaste embryonnaire prendrait naissance à partir de cellules issues de la région postérieure de l'aire embryonnaire. Dans certains cas, cette plaque pourrait même s'incurver pour former un canal archentérique typique.

Dans un mémoire récent (1953), nous avons étudié le blastoderme de l'œuf de cane non incubé, ou incubé pendant plusieurs heures. Nos observations permettent de conclure que le blastoderme est d'abord en continuité directe avec le vitellus; il est formé par un ensemble compact de blastomères. Par la suite, il tend à se séparer du vitellus qui l'entoure. Ce fait peut être observé *in vivo* et n'est donc pas un simple artefact de fixation. A partir de ce moment on observe, d'abord au niveau de la région postérieure, puis au niveau des régions latérales et antérieure, un bord enroulé (Planche 1, fig. 1 et 2). On assiste en même temps à la mise en place de l'endoblaste, qui s'effectue de l'arrière vers l'avant; il semble aussi que quelques éléments endoblastiques soient formés au niveau de la région antérieure.

D'autre part, des marques colorées au sulfate de bleu de Nil nous ont montré qu'il existe, à la surface du blastoderme, des mouvements morphogénétiques centrifuges, plus intenses au niveau de la région postérieure. Nous en avons conclu qu'il existe, autour du blastoderme, un véritable bord d'enroulement, autour duquel le matériel superficiel s'invagine pour former le feuillet profond. Mais il est possible que ce matériel soit appelé à former uniquement l'endoblaste extra-embryonnaire; il restait encore à démontrer que ce matériel peut former l'endoblaste embryonnaire proprement dit; ce dernier est, en effet, séparé du premier par un rebord vitellin, au niveau duquel l'observation est rendue délicate par la présence de nombreux granules vitellins.

Seule une étude expérimentale plus approfondie pouvait élucider ce problème. Le but de ce travail est donc de préciser, à l'aide d'une technique appropriée, l'étendue de ces mouvements morphogénétiques superficiels, ainsi que leurs relations avec l'endoblaste extra-embryonnaire et embryonnaire.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nous nous sommes adressés à des œufs de jeunes canes de race Khaki Campbell des mois de janvier à mars. Nous avons en effet pu montrer (1953) qu'à cette époque de l'année, les œufs se trouvent à un stade du développement correspondant à celui d'une morula.

Les techniques employées furent les suivantes:

1. Colorations vitales au sulfate de bleu de Nil avec fixation d'après la technique de Lehmann & de Roche (1934) ou d'après celle de Malan (1953).

2. Marques avec de fines particules d'encre de Chine solide. Pour faire ces marques, on décolle d'abord, sur un côté, le blastoderme de la membrane vitelline. Sur une aiguille de verre humide, on applique des particules d'encre de Chine. Il est ainsi possible de les amener à la surface du blastoderme. Il est cependant très délicat de les localiser à un endroit précis, du fait même que l'on est obligé de les amener sous la membrane vitelline. Très souvent des particules d'encre de Chine se trouvent sur le bord même du blastoderme.

3. Fissuration du blastoderme à l'aiguille de verre. Cette technique nous avait permis d'obtenir (Lutz, 1949) un très grand nombre d'embryons jumeaux et des monstres doubles variés. Dans le cas de fissurations perpendiculaires à l'axe présumé, la disposition des axes des embryons est ou bien conforme, c'est à dire les 2 embryons sont placés sur la même ligne en position tête contre queue — ou bien discordante, c'est à dire l'axe de l'embryon antérieur est inversé de 180° et les deux embryons sont en position tête contre tête. Il nous semblait intéressant de voir comment se forme l'endoblaste dans le cas de la gémellité expérimentale, en particulier pour la moitié antérieure du blastoderme; nous avons en effet montré (Lutz, 1953) que l'orientation des embryons est sous la dépendance de l'endoblaste.

4. Fissuration et noyade. Dans ce cas particulier, une partie du blastoderme, isolée par fissuration, est enfoncee dans le vitellus; cette opération correspond à une véritable ablation d'une partie du blastoderme.

Dans un grand nombre d'expériences, nous avons combiné les fissurations, avec ou sans noyade, avec la technique des marques à l'encre de Chine.

En réalité, nous avons abandonné très rapidement les marques colorées au sulfate de bleu de Nil. Cette substance, comme la plupart des colorants vitaux, est toujours plus ou moins toxique; il est donc nécessaire de faire des marques de faible intensité, qui s'estompent très rapidement et qu'il est délicat de suivre.

A ce propos, nous rappellerons les résultats obtenus par K. Peter (1938). Il vérifie la toxicité du sulfate de bleu de Nil. Il admet d'abord que ce produit ne serait pas toxique. Il dispose, en effet, d'une série de blastodermes marqués et incubés dans lesquels on trouve un très grand nombre de mitoses, aussi bien dans les régions marquées que dans les régions non marquées; il lui semble que dans les deux cas le nombre de mitoses est le même. Remarquons à ce sujet qu'une comparaison entre les deux régions n'est possible qu'en exprimant le résultat de cette investigation en pourcentage de mitoses. D'autre part, ce même auteur trouve que, sur 16 blastodermes marqués au sulfate de bleu de Nil, 10 se sont développés normalement jusqu'au stade de ligne primitive, tandis que les 6 autres ont formé des cas pathologiques. K. Peter est, de ce fait, obligé d'admettre que le sulfate de bleu de Nil est plus ou moins toxique.

Enfin, comme le fait remarquer Waddington (1952), cette technique ne permet pas de colorer électivement une partie du blastoderme. L'application d'une

particule d'agar agar, imprégnée d'un colorant vital, amène la coloration aussi bien du matériel superficiel que du matériel profond.

De plus, pour effectuer l'examen histologique, il est nécessaire de recourir à des techniques spéciales de fixation des marques, comme par exemple celles de Lehmann & de Roche ou celle de Malan. Il n'est pas possible de savoir jusqu'à quel point ces marques sont conservées.

Nous nous sommes donc demandés si d'autres produits ne pourraient pas remplacer avantageusement ces colorants. Spratt, dans une série de travaux entre 1942 et 1946, s'est adressé aux marques faites avec de fines particules de charbon. Mais nous avons constaté que cette technique, si elle présente déjà de gros avantages par rapport à celle des marques colorées, présente néanmoins un inconvénient; les particules de charbon ont tendance à s'infiltrer entre les membranes cellulaires.

Aussi avons-nous tenté d'employer des marques à l'encre de Chine solide (Pelikan). Ce produit n'est pas toxique. Dans une série d'expériences témoins (30 cas), nous avons appliqué de telles marques sur des blastodermes que nous avons mis en incubation pendant 48, 72, et 96 heures (Planche 1, fig. 7). Dans tous les cas des embryons entièrement normaux se sont formés. Leur développement correspond à celui d'embryons de même âge n'ayant subi aucune intervention.

De plus, les marques sont indélébiles; il est donc facile de les retrouver, après de nombreuses heures d'incubation, même après la fixation. Nous avons essentiellement employé le Zenker acide ou le Bouin comme fixateur. Pour la coloration des coupes histologiques, il est évidemment préférable d'employer des colorants qui tranchent nettement avec le noir de l'encre de Chine; l'hémalum-éosine répond à cette exigence. Enfin, les particules d'encre de Chine sont très fines (0.01 à 0.006 mm. de diamètre); elles adhèrent facilement aux membranes cellulaires et n'ont pas tendance à s'infiltrer entre ces membranes.

Mais la technique, telle que nous l'avons employée, présente un inconvénient: nous sommes obligés d'introduire les particules d'encre de Chine sous la membrane vitelline; certaines d'entre elles ne s'appliquent pas directement sur le blastoderme et restent en suspens dans l'albumine, et, de ce fait, ne seront pas entraînées par les mouvements cellulaires.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. *Expériences témoins*

Les marques colorées, à l'encre de Chine, peuvent-elles subsister et rester en place pendant un temps très long?

Pour cela des marques sont faites sur des blastodermes qui sont maintenus à la température du laboratoire (18 à 20°), pendant 27 heures. Dans les 18 cas que nous avons étudiés, aucun déplacement n'est enregistré; les marques restent éparses à la surface du blastoderme, à leur emplacement initial. Les

photographies, faites avant et après l'expérience, peuvent se superposer en tous points (Planche 1, fig. 3).

Cependant, on peut se demander s'il en est de même lorsque les œufs sont soumis à une température élevée. Il est possible, en effet, que ces marques soient entraînées par des mouvements cellulaires; mais, lorsque les marques à l'encre de Chine sont mises en place, on introduit en même temps un peu d'albumine entre la membrane vitelline et le blastoderme; par suite de l'augmentation de température, cette albumine pourrait se déplacer et entraîner en même temps les particules; il en résulterait un déplacement des marques colorées que l'on pourrait imputer à tort à des déplacements cellulaires. A cet effet, nous avons essayé de répéter ces mêmes expériences sur des blastodermes non fécondés (8 cas). Au bout de 27 heures d'incubation, les marques sont restées à leur emplacement initial (Planche 1, fig. 4). Par conséquent, si dans les expériences qui seront relatées plus bas, nous assistons à des déplacements des marques, ces déplacements ne peuvent être imputés qu'à des mouvements cellulaires qui ont entraîné les particules d'encre de Chine.

De plus, l'étude histologique montre que ces marques sont restées en place; on les retrouve uniquement à la surface des blastodermes; aucune particule ne s'est infiltrée entre les membranes cellulaires.

II. Marques colorées dans la région postérieure

Nous avons déjà étudié, dans un travail antérieur, les mouvements morphogénétiques à la surface du blastoderme par la technique des marques colorées au sulfate de bleu de Nil. Nous avons repris l'étude de ces mouvements par l'emploi des marques à l'encre de Chine solide. Les blastodermes sont orientés d'après la règle de von Baer; l'œuf est placé de façon à ce que le pôle obtus soit situé à la gauche de l'observateur. L'axe présumé du futur embryon est alors perpendiculaire au grand axe de l'œuf et sa tête dirigée vers l'avant.

Des marques à l'encre de Chine sont appliquées dans la région postérieure du blastoderme non incubé.

Exp. E.C. 23. Les particules sont disposées dans la région postérieure du blastoderme (fig. 1 dans le texte et Planche 1, fig. 5a). Après 14 heures d'incubation, nous ne retrouvons plus de particules à la surface même du blastoderme; elles bordent les bords postérieurs et postéro-latéraux. Lorsqu'on détache le blastoderme du vitellus, on retrouve des particules à la partie inférieure du blastoderme (Planche 1, fig. 5b et 6). L'étude histologique permet de retrouver ces marques au niveau du bord postérieur, à la face inférieure de l'endoblaste extra-embryonnaire ainsi qu'au niveau de l'endoblaste embryonnaire postérieur et moyen (Planche 2, fig. 8a, 8b, et 8c). La figure 1b dans le texte schématisse l'ensemble des déplacements observés dans ce cas particulier.

Exp. E.C. 14. Dans ce cas, nous avons répété la même expérience que précédemment (fig. 2 dans le texte). L'étude macroscopique du blastoderme après 14 heures d'incubation (Planche 2, fig. 9a) donne les mêmes résultats que

l'expérience E.C. 23. L'étude histologique, de son côté, confirme le résultat antérieur. Les marques à l'encre de Chine se retrouvent au niveau du bord postérieur, dans le rebord vitellin et à la face inférieure de l'endoblaste embryonnaire (Planche 2, fig. 9b). Les résultats d'ensemble sont donnés dans la figure 2b dans le texte.

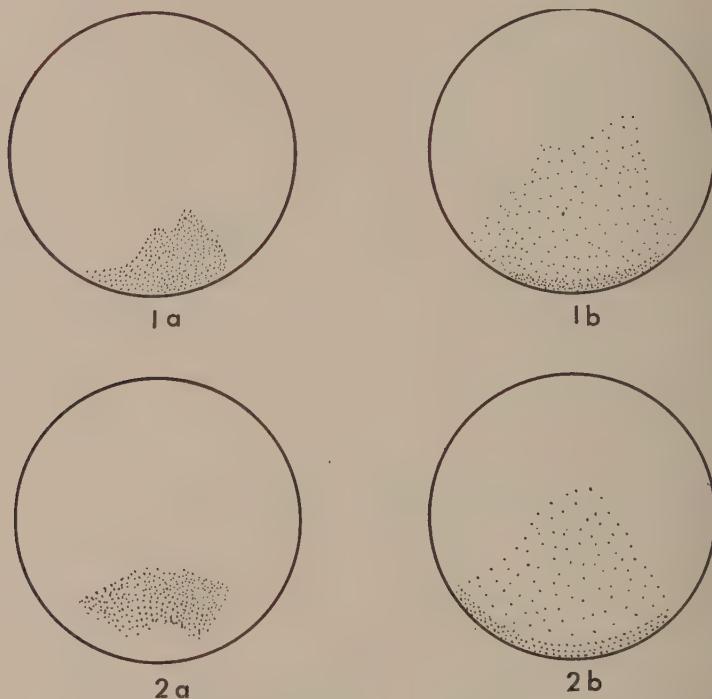


FIG. 1a et 2a. Blastoderme non incubé avec les marques à l'encre de Chine solide sur la région postérieure.

FIG. 1b et 2b. Représentation schématique des particules retrouvées après 14 heures d'incubation; placées sur la face supérieure du blastoderme, elles se trouvent maintenant sur la face inférieure de l'endoblaste; au niveau du bord postérieur il y a un amoncellement de particules.

Nous avons effectué 52 expériences de ce type. Dans tous les cas, les marques à l'encre de Chine solide se déplacent au cours de l'incubation; elles festonnent les bords postérieurs et postéro-latéraux. L'étude histologique permet de retrouver de nombreuses particules, soit isolées, soit en chapelet, au niveau de l'endoblaste embryonnaire et extra-embryonnaire. Il est important de relever à ce sujet que ces particules sont situées, non pas à un niveau quelconque du blastoderme, mais uniquement au niveau de la face inférieure de l'endoblaste.

Dans une autre série expérimentale, nous avons laissé évoluer les blastodermes marqués pendant 48, 72 et même 90 heures, afin d'éprouver la toxicité

du produit employé. Nous avons aussi essayé de retrouver les particules d'encre de Chine sur de tels embryons; nous avons en particulier étudié des embryons de 12, 20, et 36 somites. La technique d'éclaircissement au toluène permet de repérer macroscopiquement les particules d'encre de Chine; elles sont situées le long du bord de la gouttière intestinale (Planche 1, fig. 7).

Comment comprendre ces résultats? Il est difficile d'admettre que ces granules d'encre de Chine se soient simplement infiltrés entre les membranes cellulaires; dans ce cas, on les retrouverait à tous les niveaux du blastoderme. On les trouve, par contre, depuis la région du bord postérieur jusqu'à la région moyenne et toujours sur la face inférieure de l'endoblaste. Il existe donc un grand décalage entre les marques posées sur le feuillet externe et celles retrouvées sur la face inférieure de l'endoblaste. Or, nous savons qu'au niveau du bord postérieur, le matériel superficiel et le matériel endoblastique extra-embryonnaire sont en relation directe. Il est donc possible d'admettre qu'à ce niveau existe un véritable bord d'enroulement, autour duquel le matériel superficiel s'invagine pour former l'endoblaste extra-embryonnaire. Le rebord vitellin ne constitue pas un rebord infranchissable à ce matériel qui continue sa progression au travers de cette région pour former l'endoblaste embryonnaire. La disposition des particules d'encre de Chine devient alors compréhensible. Ces particules sont d'abord situées sur le feuillet superficiel qui les entraîne autour du bord d'enroulement, et dans ces conditions, on les retrouve à la face inférieure du feuillet invaginé. Il est donc normal que, par la suite, elles se localisent au niveau de la gouttière intestinale d'embryons évolués.

III. *Marques colorées au niveau de la région antérieure*

Nous nous sommes demandés si des mouvements morphogénétiques, analogues à ceux enregistrés dans les régions postérieures et latéro-postérieures, existaient au niveau de la région antérieure. Pour cela nous avons fait des marques d'encre de Chine au niveau de la région antérieure.

Exp. E.C. 33. Des marques sont disposées près du bord de la région antérieure du blastoderme (fig. 3a dans le texte). Après 15 heures d'incubation, les bords antérieurs sont mouchetés de particules d'encre de Chine qui pénètrent sous le blastoderme; elles ont presque entièrement disparu de la surface du blastoderme (Planche 2, fig. 10a). L'étude histologique permet de retrouver ces marques tout autour du bord antérieur et à la face inférieure de l'endoblaste extra-embryonnaire; elles sont aussi visibles au niveau du rebord vitellin, et un peu en arrière de ce rebord, sur la face inférieure de l'endoblaste antérieur (Planche 2, fig. 10b). Les résultats d'ensemble de cette expérience sont donnés par la figure 3b dans le texte.

Exp. E.C. 39. Nous avons répété la même expérience que plus haut (fig. 4a dans le texte). Après 15 heures d'incubation, nous observons des résultats analogues aussi bien dans l'étude macroscopique que dans l'étude histologique de ce blastoderme (fig. 4b dans le texte et Planche 2, fig. 11).

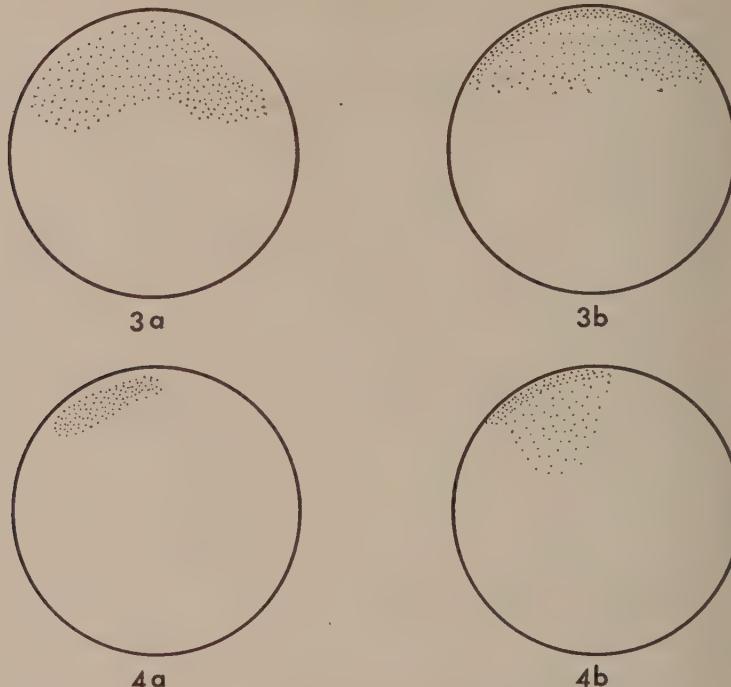


FIG. 3a et 4a. Blastoderme non incubé avec marques à l'encre de Chine au niveau de la région antérieure de la face inférieure superficielle du blastoderme. FIG. 3b et 4b. Particules après 15 heures d'incubation; les particules gagnent d'abord le bord antérieur, puis continuent leur cheminement sur la face inférieure de l'endoblaste, où elles sont retrouvées; très nombreuses particules au niveau du bord antérieur. Partout ailleurs elles sont plus disséminées.

Nous avons effectué, au total, 26 expériences de ce type. Dans les 26 cas, les marques d'encre de Chine soulignent les bords antérieurs et antéro-latéraux. L'étude histologique permet de retrouver de telles marques sur la face inférieure de l'endoblaste extra-embryonnaire et sur la face inférieure de l'endoblaste embryonnaire antérieur; mais elles ne dépassent pas le tiers antérieur. Dans un seul cas, ces particules se retrouvent jusqu'au niveau de la région médiane de la face inférieure de l'endoblaste embryonnaire. Ce cas ressemble de près à ceux observés dans la série précédente. Il est donc probable qu'il s'agit là d'un blastoderme à orientation inverse par rapport à la normale.

L'étude du déplacement des marques d'encre de Chine au niveau du bord antérieur permet de faire les mêmes observations que dans le cas précédent: le matériel superficiel s'invagine autour du bord antérieur pour former de l'endoblaste extra-embryonnaire, mais il ne semble contribuer que pour une faible part à la formation de l'endoblaste embryonnaire. Seuls les éléments les plus antérieurs de ce feuillet relèvent de sa formation.

Dès maintenant il est possible de faire une synthèse de l'ensemble de ces résultats. Le bord postérieur forme la majorité de l'endoblaste, tandis que le bord antérieur ne forme que la région la plus antérieure de ce feuillet. D'ailleurs, des marques d'encre de Chine, disposées sur la région centrale d'un blastoderme, soulignent, après 15 heures d'incubation, aussi bien les bords postérieur, qu'antérieur et latéraux (Planche 3, fig. 15). Ce résultat met nettement en relief l'activité de tous les bords du blastoderme. Il correspond, en somme, à un véritable résultat d'ensemble des expériences relatées plus haut.

Ce résultat pose cependant un problème; si les marques centrales sont refoulées sur tout le pourtour du blastoderme, on peut se demander d'où provient le matériel superficiel central. Or comme le font remarquer Gräper (1929), Mehrbach (1935), Pasteels (1937), il existe au niveau du feuillet externe de nombreuses mitoses; il y a donc là une source certaine de matériel de remplacement.

Une source accessoire de matériel superficiel pourrait être fournie par les cellules en 'poire'. Patterson (1909), Jacobson (1938), Pasteels (1945) montrent en effet que ces cellules dans lesquelles on voyait d'abord des cellules s'infiltrant pour former de l'endoblaste, pourraient fort bien être des cellules profondes qui viennent en surface. Ce sont en effet des cellules riches en granules vitellins, alors que les cellules ectoblastiques ne renferment que peu de granules; ce fait semble bien montrer qu'il s'agirait plutôt de cellules profondes qui s'infiltrent dans le feuillet superficiel.

Quant à la région de l'endoderme non atteinte par les marques d'encre de Chine, elle est formée par du matériel qui échappe à nos investigations. Elle est peut-être due à du matériel extra-embryonnaire, qui est en place avant l'application des marques et qui a été poussé vers l'avant par le matériel qui s'invagine.

IV. *Fissuration perpendiculaire à l'axe présumé*

Les expériences de la série précédente ont montré que du matériel superficiel peut devenir endoblastique, même au niveau de la région antérieure du blastoderme. On peut se demander, si, à la suite d'une fissuration perpendiculaire à l'axe présumé, l'activité de cette région antérieure n'est pas augmentée. A cet effet, nous avons répété nos expériences antérieures de marques à l'encre de Chine, et fissuré le blastoderme perpendiculairement à l'axe présumé.

Exp. E.C. 62. Les marques à l'encre de Chine sont disposées en arc de cercle sur la moitié antérieure du blastoderme, isolée physiologiquement (fig. 5a dans le texte). Après 15 heures d'incubation, le bord antérieur est fortement souligné en noir par les particules d'encre de Chine (Planche 3, fig. 12a). L'étude histologique permet de retrouver ces marques sur le bord antérieur de cet hémiblastoderme, ainsi que sur la surface inférieure de l'endoblaste, jusque dans la région voisine de la fissure. A ce niveau s'est constitué un nouveau bord postérieur (Planche 3, fig. 12b). Les résultats d'ensemble de cette expérience sont donnés sur la figure 5b dans le texte.

Nous avons effectué 15 expériences de ce type. Dans tous les cas, les marques

colorées se déplacent pendant l'incubation. Elles viennent occuper le bord antérieur ainsi que la surface inférieure de l'endoblaste extra-embryonnaire et embryonnaire; certaines d'entre elles se trouvent jusque dans une région très voisine de la fissure. A ce niveau, un bord néoformé s'est constitué, simulant un bord enroulé normal.

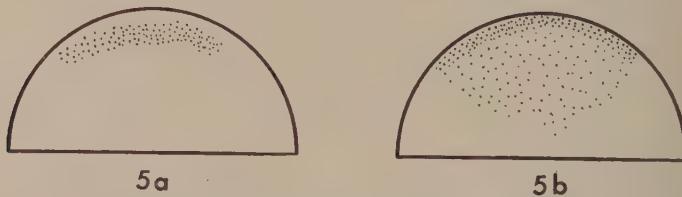


FIG. 5. Moitié antérieure d'un blastoderme fissuré perpendiculairement à l'axe présumé. Des marques, disposées près du bord antérieur (Fig. 5a), se trouvent après 15 heures d'incubation (Fig. 5b) sur la face inférieure de l'endoblaste; la répartition des particules est inégale; près du bord antérieur il existe un véritable feston de particules, alors que sur l'endoblaste embryonnaire elles sont plus disséminées.

Ces expériences, effectuées sur des blastodermes des premiers mois de l'année, permettent de montrer, qu'à la suite d'une fissuration perpendiculaire à l'axe présumé, le bord antérieur a augmenté son activité normale. Il est capable, à la suite d'une ablation d'une partie importante du blastoderme, de se substituer à lui. En somme, normalement, la région antérieure ne peut déployer toute son activité; elle est comme inhibée par la région postérieure.

V. Fissuration postérieure perpendiculaire à l'axe présumé

Dans les expériences précédentes nous avons mis en relief l'activité du bord antérieur quand la région antérieure est isolée physiologiquement. On peut cependant se demander s'il en est de même, lorsque la fissure, au lieu de passer dans la région médiane, passe au niveau d'une région située plus en arrière. En effet, dans ces conditions, la partie du blastoderme ainsi isolée, peut présenter, au niveau de la section, une région au niveau de laquelle il existe déjà des îlots endoblastiques.

Nous avons mené, au niveau du quart postérieur du blastoderme une fissure perpendiculaire à l'axe présumé. La partie postérieure isolée est noyée dans le vitellus. Seule la partie antérieure est maintenue en place. On dispose alors, sur elle, des marques colorées à l'encre de Chine.

L'opération a pour but d'éliminer la région extra-embryonnaire.

Exp. E.C. 120. Après ablation du quart postérieur du blastoderme, des marques d'encre de Chine solide sont disposées dans la région située en avant de la section (fig. 6a dans le texte). Après 14 heures d'incubation, de nombreuses particules noires soulignent le bord postérieur (Planche 3, fig. 13a). L'étude histologique montre que le bord de la section s'est incurvé et est en rapport avec

l'endoblaste. Des particules d'encre de Chine se trouvent à la face inférieure de l'endoblaste postérieur et moyen; elles entourent aussi le bord enroulé (Planche 3, fig. 13b). La figure 6b dans le texte donne les résultats d'ensemble de cette expérience.

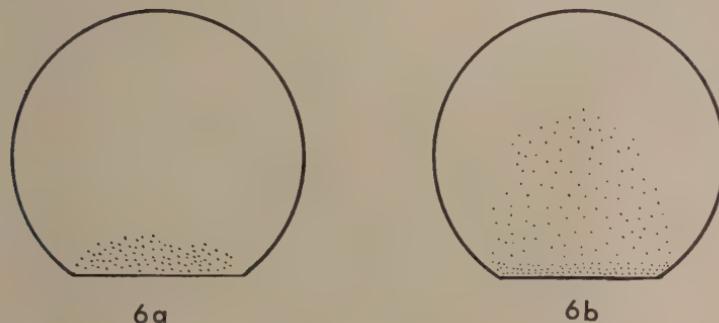


FIG. 6. Blastoderme fissuré perpendiculairement à l'axe présumé; la partie postérieure a été noyée dans le vitellus. Des marques d'encre de Chine disposées sur le blastoderme non incubé (Fig. 6a), s'enroulent autour du bord de la section et se retrouvent après 14 heures d'incubation (Fig. 6b) sur la face inférieure de l'endoblaste.

Nous avons effectué 31 expériences de ce type. Dans les 31 cas nous avons constaté que les particules d'encre de Chine migrent vers le bord de la section. Le bord postérieur forme un bourrelet renflé; dans tous les cas observés, il est difficile de le distinguer du bord antérieur; seules les marques d'encre de Chine facilitent cette opération. Ces marques se trouvent sur la face inférieure de l'endoblaste jusqu'au niveau de la région moyenne du blastoderme. Il est donc possible d'assimiler ce bord à un bord d'enroulement autour duquel du matériel superficiel s'invagine pour former le deuxième feuillett embryonnaire.

Ces expériences montrent donc qu'en l'absence d'un rebord vitellin, le bord postérieur peut néanmoins s'enrouler. Dans tous les cas observés, cet enroulement est typique. Il est vrai que les conditions, dans lesquelles il est placé dans ces expériences, sont différentes des conditions normales. Aucun obstacle mécanique, en particulier du vitellus sous-jacent, ne complique son enroulement. Dans la normale, ce bord postérieur repose directement sur le vitellus; le bord blastodermique rencontre alors un obstacle plus ou moins important; dans ces conditions, il est compréhensible que ce bord ne présentera pas toujours un aspect typique — il pourra être plus ou moins allongé — mais le feuillett supérieur reste en continuité directe avec l'endoblaste.

VI. Marques colorées après fissuration parallèle à l'axe présumé

Dans cette série expérimentale, nous avons d'abord disposé deux bandes de marques parallèles entre elles et à l'axe présumé, puis nous avons fissuré le blastoderme entre les deux séries de marques.

Exp. E.C. 49. Après 15 heures d'incubation, des particules d'encre de Chine se sont tassées le long des bords de la fissure et sur les bords postérieurs des deux hémiblastodermes (fig. 7a et 7b dans le texte). Des coupes histologiques, menées perpendiculairement à la section montrent tout d'abord qu'au niveau de la section le matériel cellulaire superficiel est en continuation directe avec le matériel endoblastique. Des particules d'encre de Chine soulignent extérieurement ce bord de néoformation; d'autres particules se retrouvent sur la face inférieure de l'endoblaste (Planche 3, fig. 14).

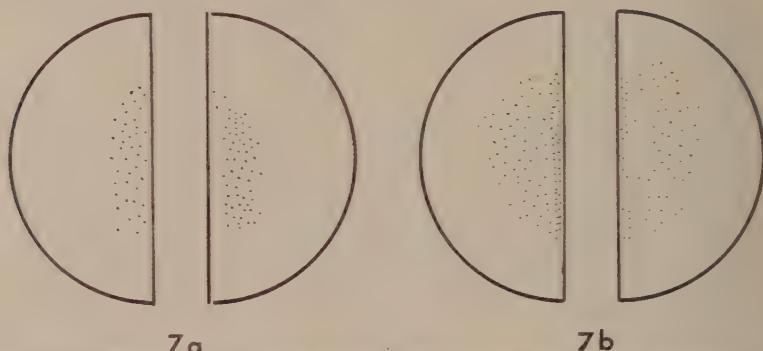


FIG. 7. Blastoderme non incubé fissuré parallèlement à l'axe présumé et marqué à l'encre de Chine (Fig. 7a); après 15 heures d'incubation on retrouve ces marques à la face inférieure de l'endoblaste (Fig. 7b).

Nous avons effectué au total 30 expériences de ce type. Dans toutes les expériences les marques à l'encre de Chine se sont déplacées après 15 à 16 heures d'incubation. Elles bordent les lèvres de la fissure et, dans 8 cas, la région postérieure de 2 hémiblastodermes. L'étude histologique met en relief un bord d'enroulement néoformé au niveau de la fissure. Ce bord, ainsi que la face inférieure de l'endoblaste situé immédiatement en arrière de ce bord, sont soulignés par des particules d'encre de Chine.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les expériences relatées plus haut nous permettent d'apporter une contribution à la formation de l'endoblaste chez les Oiseaux. Il semble bien que ce feuillet se forme essentiellement par invagination de matériel superficiel autour des bords postérieur, antérieur et latéraux. Pourtant, c'est au niveau du bord postérieur que s'enroule la majeure partie de ce matériel. Il forme aussi bien l'endoblaste extra-embryonnaire que l'endoblaste embryonnaire proprement dit. En somme, nous reprenons ici les idées défendues par M. Duval (1884) et Patterson (1909) et à qui Mehrbach (1935) avait donné la valeur d'une source accessoire d'endoblaste. Or, une telle théorie suppose qu'il existe autour des bords du blastoderme une continuité directe entre le matériel superficiel et le matériel profond.

L'étude macroscopique *in vivo* nous montre que le blastoderme, incubé pendant quelques heures, est entouré par un sillon qui le sépare nettement du vitellus. D'autre part, l'étude histologique permet de retrouver, à ce niveau, un bord enroulé plus ou moins bien formé. Un tel bord a été observé par M. Duval (1884), Patterson (1909), Wetzel (1929), Pasteels (1937), et Peter (1938); ce dernier l'attribue à un artefact de fixation. Il est vrai que, dans certains cas, ce bord ne présente pas cet aspect boursouflé caractéristique. 'L'examen de ces figures montre à quel point il est impossible de se décider en faveur d'une invagination — ou d'une absence d'invagination à ce niveau. Bien pis, un autre œuf, prélevé au même stade, n'offre aucune différenciation, mais un pourtour parfaitement arrondi et plat' (Pasteels, 1937, p. 396).

A ce sujet, il y a lieu de faire une première remarque: il est difficile de parler d'un même stade de développement, exprimé simplement en heures d'incubation, car au moment de la ponte, les œufs se trouvent à un stade réel de développement plus ou moins avancé. Il est donc nécessaire d'opérer sur de nombreux blastodermes pour retrouver des stades analogues.

D'autre part, l'étude des marques colorées à l'encre de Chine permet de donner, même à ces bords qui se présentent sous un aspect 'atypique', une valeur de bord d'enroulement: ils sont soulignés par de fines particules noires. Ceci laisse à supposer que, dans ces cas, par suite de la présence d'un obstacle mécanique représenté ici par des granules de vitellus, le bord boursouflé s'est plus ou moins aplati.

D'ailleurs les bords d'enroulement néoformés à la suite de fissuration à l'aiguille de verre, sont toujours caractéristiques et simulent un véritable bord postérieur; ceci résulte sans doute du fait qu'au niveau des fissures existe une cavité sous-germinale. Aucun obstacle ne s'oppose alors à la formation d'un tel bord. On pourrait supposer qu'à la suite de l'opération le bord de la section se contracte et a tendance à s'enrouler sur lui-même; mais dans ces conditions, comment comprendre la continuité qui existe entre le matériel superficiel et l'endoblaste; de plus, la présence de particules d'encre de Chine, sur le bord et sur l'endoblaste voisin, ne laisse aucun doute à ce sujet: il ne s'agit pas d'une simple contraction, mais d'un véritable bord d'enroulement.

D'autre part pouvons-nous réellement parler de mouvements morphogénétiques à la surface du blastoderme pendant les premières heures de l'incubation?

A la suite d'expériences de marques colorées, Pasteels (1937), Twisselmann (1938), et Peter (1938) mettent en doute l'existence de tels mouvements. Pourtant Peter (1938) a observé, que des marques colorées au sulfate de bleu de Nil peuvent s'agrandir et même se déplacer. Mais l'étude histologique lui montre que ces marques existent aussi bien sur l'ectoblaste que sur l'endoblaste et qu'elles ont même étendue. Il ne peut, dans ces conditions, admettre que l'un des feuillets se déplace par rapport à l'autre. Or Peter admet qu'il est quasi impossible de colorer sélectivement un feuillet déterminé. Si donc l'un des feuillets se déplace réellement, les marques colorées de celui-ci coloreront les

parties situées au-dessous de lui. Et Peter ajoute même: 'Dazu kommt noch die oft gleiche Nuance der Farbe in übereinander gelegener Zellen' (1938, p. 407). La couleur n'est donc pas toujours la même dans l'un et l'autre feuillet, ce qui nous permettrait de conclure que l'un des feuillets a été coloré secondairement par l'autre. Ces réserves montrent la difficulté d'interpréter les expériences de marques colorées.

Dans un mémoire récent (Lutz & Reyrolles, 1952; Lutz, 1953), nous avons montré que de tels mouvements existaient réellement à la surface du blastoderme; ce résultat avait été obtenu par l'emploi de marques colorées au sulfate de bleu de Nil, après 6 à 7 heures d'incubation; les déplacements observés étaient de faible amplitude. A titre de comparaison, nous avons refait les mêmes expériences avec des particules d'encre de Chine solide; après la même durée d'incubation, 6 à 7 heures, des particules noires soulignent déjà les bords du blastoderme; après 14 à 16 heures d'incubation, les résultats sont encore plus nets et ne laissent aucun doute à ce sujet; il nous semble difficile d'apporter une autre explication aux résultats obtenus.

Cependant on pourrait admettre qu'au bout de 14 à 16 heures d'incubation, le blastoderme se trouve à un stade réel très voisin de celui de la formation de la ligne primitive; les mouvements enregistrés correspondraient alors à ceux existant au moment de la formation de cette dernière. Or, la ligne primitive n'apparaît pour le matériel que nous avons employé qu'après 24 à 27 heures d'incubation (25 expériences témoins). D'autre part, nous avons remarqué l'existence de ces mouvements après 5, 7, et 10 heures d'incubation. Mais ce n'est qu'au bout de 9 à 16 heures d'incubation que l'on obtient des figures aussi nettes que celles que nous rapportons ici, où toutes les marques ont gagné les bords du blastoderme.

Que devons-nous penser, dans ces conditions, de la théorie de Peter (1938)? Si nous observons de jeunes blastodermes non incubés d'œufs de cane, nous voyons qu'ils sont formés par un amas massif de cellules. A des stades plus évolués, nous voyons apparaître l'endoblaste définitif, d'abord dans la région postérieure, puis dans la région moyenne et antérieure. Pour Peter, la formation de ce deuxième feuillet est accompagnée par l'apparition d'espaces cellulaires qui bientôt confluent pour séparer la couche profonde de la couche superficielle. 'Mais, comme nous l'avons fait remarquer chez les Reptiles, s'agit-il bien de la formation du véritable endoblaste de l'embryon définitif? Ne s'agit-il pas plutôt d'un arrangement cellulaire prégastruléen, d'une blastulation. L'interstice apparu ainsi au cours de la segmentation entre les cellules profondes et les cellules superficielles aurait une valeur d'un blastocoïde' (Pasteels, 1940, p. 88).

D'autre part, comment expliquer le fait relevé par Mehrbach (1935) confirmé par Pasteels (1937) que pendant les premières heures de l'incubation les mitoses sont plus nombreuses dans l'ectoblaste primaire et que cependant le diamètre du blastoderme diminue? Ceci semble bien montrer qu'une partie au moins de ce matériel passe en profondeur. Pour Mehrbach (1935) et Pasteels (1937), il y aurait polyinvagination; des cellules, riches en vitellus, glissent à l'intérieur pour

former l'endoblaste. Or de telles figures se rencontrent réellement mais en très petit nombre. Mais comme le font remarquer Patterson (1909), Jacobson (1938), Pasteels (1945) il s'agirait là de cellules qui viendraient en surface.

Ces cellules, et surtout les nombreuses cellules résultant des mitoses que l'on observe dans le feuillet superficiel, contribuent sans doute à former du matériel de remplacement; les mouvements morphogénétiques demandent en effet un appel de matériel; il est alors formé sur place par les phénomènes de mitoses et en faible partie peut-être par les cellules 'en poire'.

Quant à la théorie soutenue par Jacobson (1938), elle n'a été confirmée par aucun auteur qui a étudié la question de la formation de l'endoblaste. D'après cet auteur, il existerait un archenteron endoblastique, précédant la ligne primitive. Il nous semble qu'il s'agit là d'une observation fortuite. On pourrait peut-être la rapprocher des observations de Koller (1882); certains blastodermes d'oeuf de poule présentent en effet, entre l'aire embryonnaire et l'aire extra-embryonnaire, une sorte de croissant (Butler, 1935; Lutz, 1940 et 1949). Mais la formation d'un véritable sillon (qui d'après Jacobson correspondrait au tube archentérique) est exceptionnelle.

Pasteels (1937) a montré combien il est difficile, à la suite d'un simple examen histologique, de conclure sur ce problème. Les différentes thèses émises successivement en sont la preuve. Par contre, les faits exposés dans ce mémoire, basés sur des résultats expérimentaux, ne semblent laisser aucun doute quant à la formation de l'endoblaste chez les oiseaux. Il est impossible de conclure que le feuillet interne se forme par simple délamination qui s'effectue sur place; la théorie de la polyinvagination ne peut non plus être soutenue. L'application de particules devrait alors entraîner la formation de blastoderms à feuilllets superficiel et endoblastique séparés par des particules d'encre de Chine, or nous les trouvons à la face inférieure du feuillet interne.

Toutes les observations et expériences concordent au contraire, à démontrer que le feuillet endoblastique, aussi bien extra-embryonnaire qu'embryonnaire, se forme essentiellement par enroulement autour du bord postérieur (qui joue, dans ce phénomène, un rôle capital), des bords latéraux et du bord antérieur. Ce dernier subit d'ailleurs une inhibition provoquée par le bord postérieur.

En somme, les phénomènes de la gastrulation chez les Oiseaux s'effectuent en deux temps: d'abord il y a mise en place de l'endoblaste, puis du mésoblaste.

Un même et unique processus est à la base de la formation de l'un et de l'autre feuillet; il s'agit des mouvements morphogénétiques superficiels. D'abord centrifuges, ces mouvements forment l'endoblaste — mais, lorsque celui-ci est en place, ces mouvements sont déviés et contribueront à la formation de la ligne primitive.

RÉSUMÉ

La technique de marques faites avec de fines particules d'encre de Chine, disposées sur le blastoderme non incubé d'œuf de Cane, permet de conclure:

- (1) à l'existence de mouvements morphogénétiques superficiels pendant les premières heures de l'incubation;
- (2) à l'enroulement de matériel superficiel autour des bords postérieur, latéraux et antérieur;
- (3) à la continuité directe du matériel endoblastique extra-embryonnaire et embryonnaire.

Le feuillet endoblastique se forme donc par enroulement de matériel superficiel autour des bords postérieur, latéraux et antérieur.

SUMMARY

The technique of marking the unincubated duck blastoderm with fine particles of Chinese ink leads to the following conclusions:

- (1) there exist superficial morphogenetic movements during the first few hours of incubation;
- (2) surface material rolls round the posterior, lateral, and anterior margins;
- (3) there is a direct continuity between extra-embryonic and embryonic endoblast.

The endoblastic layer forms therefore by surface material rolling round the posterior, lateral, and anterior margins.

TRAVAUX CITÉS

BUTLER, E. (1935). The developmental capacity of regions of the unincubated chick blastoderm as tested in chorio-allantoic grafts. *J. exp. Zool.* **70**, 357-96.

DUVAL, M. (1884). De la formation du blastoderme dans l'œuf d'Oiseau. *Ann. Sci. Nat., Zool.* **18**, 1-208.

GRÄPER, L. (1929). Die Primitiventwicklung des Hühnchens nach Stereo-kinematographischen Untersuchungen, kontrolliert durch vital Farbmarkierung und verglichen mit der Entwicklung anderer Wirbeltiere. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **116**, 383-429.

JACORSON, W. (1938). The early development of the avian embryo. I. Endoderm formation. *J. Morph.* **62**, 415-43.

KIONKA, H. (1894). Die Furchung des Hühnereies. *Anat. Heft*, **3**, 391-445.

KOLLER, E. (1882). Untersuchungen über die Blätterbildung im Hühnchenkeim. *Arch. mikr. Anat.* **20**, 174-211.

LEHMANN, F., & DE ROCHE, V. (1934). Über die Verwendbarkeit des Dioxans an Stelle von Alkohol bei histologischen Verarbeitung nilblau gefärbter Embryonalgewebe. *Rev. suisse Zool.* **41**, 367-9.

LUTZ, H. (1940). Sur l'orientation du blastoderme non incubé de Poulet. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **209**, 450-2.

— (1949). Sur la production expérimentale de la polyembryonie et de la monstruosité double chez les Oiseaux. *Arch. Anat. micr.* **79**, 79-144.

— (1953). L'orientation des axes embryonnaires dans la gemellité expérimentale chez les Oiseaux et son déterminisme. *Bull. biol.* **87**, 34-67.

— & REYROLLES, J. (1952). Sur le développement de l'endoderme dans l'œuf d'Oiseau. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **234**, 1480-2.

MALAN, M. E. (1953). The elongation of the primitive streak and the localization of the presumptive chorda-mesoderm on the early chick blastoderm studied by means of coloured marks with nile blue sulphate. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **64**, 149–88.

MEHRBACH, H. (1936). Beobachtungen an der Keimscheibe des Hühnchens vor der Erscheinung des Primitivstreifens. *Z. ges. Anat. I. Z. Anat. EntwGesch.* **104**, 635–52.

PASTEELS, J. (1937). Etude sur la gastrulation des Vertébrés méroblastiques. III. Oiseaux. IV. Conclusions générales. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **48**, 381–488.

— (1940). Un aperçu comparatif de la gastrulation chez les Chordés. *Biol. Rev.* **15**, 59–106.

— (1945). On the formation of the primary endoderm of the duck (*Anas domestica*) and the significance of the bilaminar embryo in birds. *Anat. Rec.* **93**, 5–21.

PATTERSON, J. (1909). Gastrulation in the pigeons' egg. A morphological and experimental study. *J. Morph.* **20**, 65–123.

PETER, K. (1938). Untersuchungen über die Entwicklung des Dotterentoderms. 1. Die Entwicklung des Entoderms beim Hühnchen. 2. Die Entwicklung des Entoderms bei der Taube. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **43**, 362–450.

— (1939). Untersuchungen über die Entwicklung des Dotterendoderms. 4. Das Schicksal des Dotterendoderms beim Hühnchen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **46**, 627–39.

SPRATT, N. (1942). Location of organ specific regions and their relationship to the development of the primitive streak in the early chick blastoderm. *J. exp. Zool.* **89**, 69–101.

— (1946). Formation of the primitive streak in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles. *J. exp. Zool.* **103**, 259–303.

TWIESSELMANN, F. (1938). Expériences de scission précoce de l'aire embryogène chez le Poulet. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **49**, 285–367.

WADDINGTON, C. H. (1952). *The Epigenetics of Birds*. Cambridge: The University Press.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1

FIG. 1. Bord postérieur typique d'un blastoderme de Canard incubé pendant 12 heures. Coupe antéro-postérieure.

FIG. 2. Bord postérieur d'un blastoderme de Canard mettant nettement en relief la continuité entre la couche superficielle et l'endoblaste. Coupe antéro-postérieure.

FIG. 3. Blastoderme avec particules d'encre de Chine. Après marquage, le blastoderme a été maintenu à une température de 18 à 20° pendant 27 heures. On n'enregistre aucun déplacement des particules.

FIG. 4. Blastoderme non fécondé, avec particules d'encre de Chine. Après 27 heures d'incubation (à 38,5°) les marques n'ont subi aucun déplacement.

FIG. 5a. Blastoderme photographié après la mise en place de particules d'encre de Chine.

FIG. 5b. Même blastoderme après 14 heures d'incubation; les particules bordent le bord postérieur: le blastoderme est vu d'en haut.

FIG. 6. Blastoderme avec particules d'encre de Chine, après 14 heures d'incubation. Le blastoderme, partiellement retourné, montre la face inférieure du bord postérieur; on remarque au niveau du bord postérieur de nombreuses particules d'encre de Chine; les autres sont plus ou moins camouflées par le vitellus.

FIG. 7. Embryon de 32 somites, photographié après éclaircissement. On remarque, dans la gouttière intestinale, de nombreuses particules d'encre de Chine solide; les marques avaient été mises sur la région postérieure du blastoderme non incubé.

PLANCHE 2

FIG. 8a. Marques de charbon sur la face inférieure de l'endoblaste, au niveau du rebord vitellin postérieur d'un blastoderme incubé de 14 heures. Coupe antéro-postérieure.

FIG. 8b. Même blastoderme, même coupe, mais photographié en avant du rebord vitellin.

FIG. 8c. Même blastoderme, même coupe, région centrale.

FIG. 9a. Blastoderme incubé pendant 14 heures. Le bord postérieur est festonné de particules de charbon mises sur le blastoderme avant l'incubation.

FIG. 9b. Même blastoderme. Région centrale. On remarque sur la face inférieure de l'endoblaste de nombreuses particules de charbon. Coupe antéro-postérieure.

FIG. 10a. Blastoderme incubé pendant 15 heures. Le bord antérieur est festonné de particules d'encre de Chine solide, mises en place sur la partie antérieure du blastoderme non incubé.

FIG. 10b. Même blastoderme. Coupe antéro-postérieure. Région antérieure. On remarque les particules de charbon sur la face inférieure de l'endoblaste.

FIG. 11. Coupe antéro-postérieure d'un blastoderme. Région située en arrière du rebord vitellin. Des particules d'encre de Chine se trouvent sur la face inférieure de l'endoblaste.

PLANCHE 3

FIG. 12a. Blastoderme fissuré perpendiculairement à l'axe présumé et marques à l'encre de Chine solide près du bord antérieur; après 15 heures d'incubation, on observe que les particules noires soulignent le bord antérieur; la fissuration est encore visible.

FIG. 12b. Moitié antérieure du même blastoderme. Des particules d'encre de Chine s'observent sur la face inférieure de l'endoblaste.

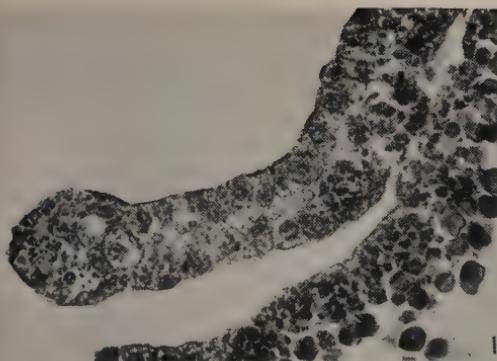
FIG. 13a. Blastoderme fissuré perpendiculairement à l'axe présumé, au niveau du tiers postérieur. Des particules d'encre de Chine sont disposées sur la partie subsistante en avant de la section. La partie isolée est noyée dans le vitellus. Après 14 heures d'incubation, ces particules soulignent le bord fissuré.

FIG. 13b. Coupe de ce bord fissuré après 14 heures d'incubation. Formation d'un bord d'enroulement néoformé. Des particules d'encre de Chine se trouvent sur la face inférieure de l'endoblaste.

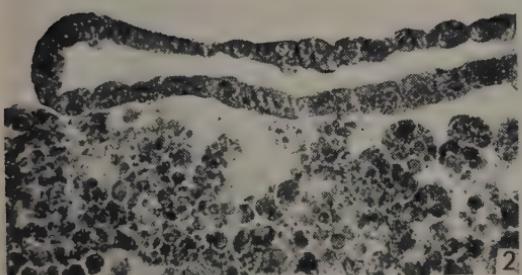
FIG. 14. Blastoderme fissuré parallèlement à l'axe présumé. On observe, après incubation, le bord d'enroulement néoformé. Les particules d'encre de Chine, qui avaient été placées sur la face supérieure du blastoderme, se retrouvent sur la face inférieure de l'endoblaste; mais vu la finesse de ces particules, elles ne ressortent pas nettement sur cette microphotographie.

FIG. 15. Blastoderme incubé pendant 14 heures. Des particules d'encre de Chine avaient été déposées, à un stade non incubé, sur la région centrale; elles soulignent maintenant les bords postérieur, antérieur et latéraux.

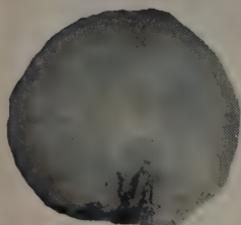
(*Manuscript received 12 : vi : 54*)



3



4



5a



5b



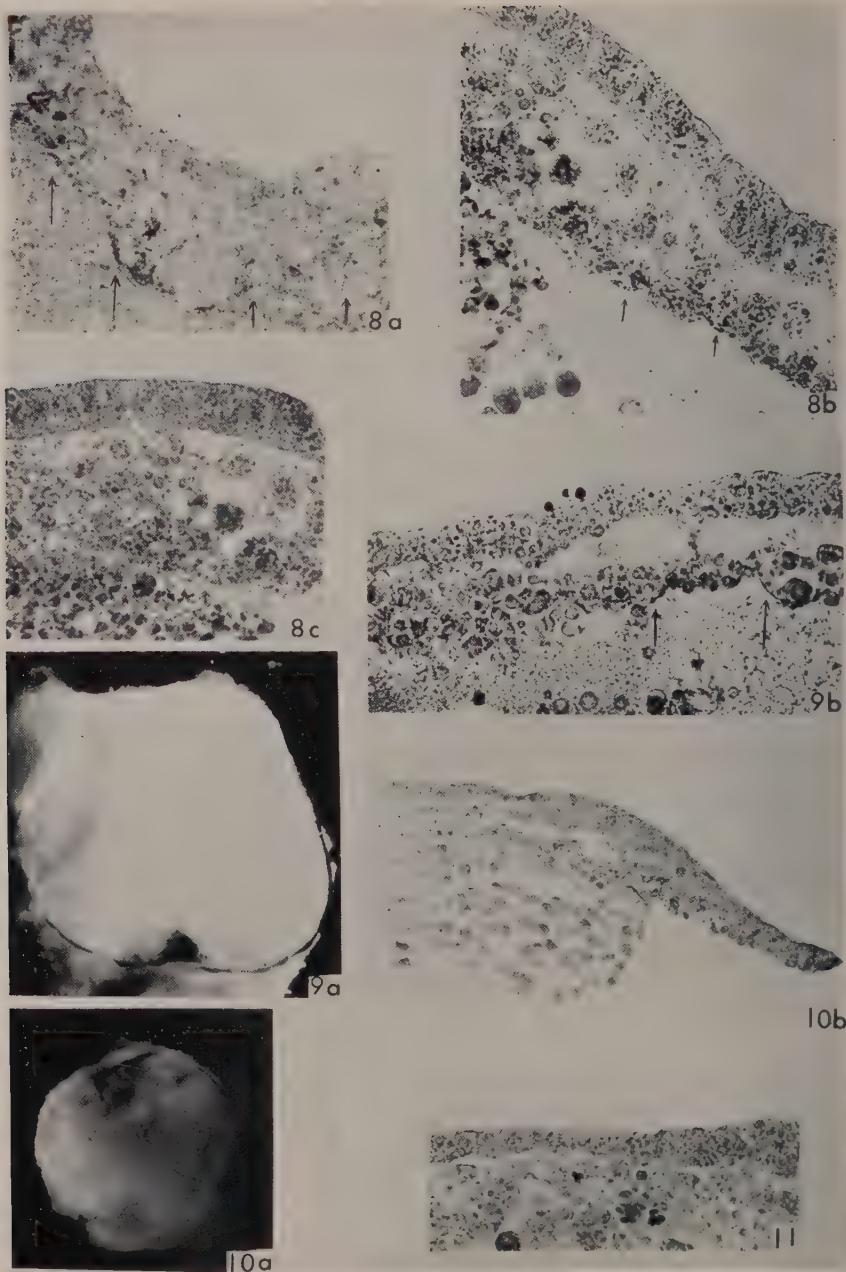
6



7

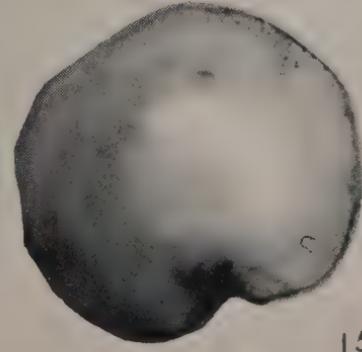
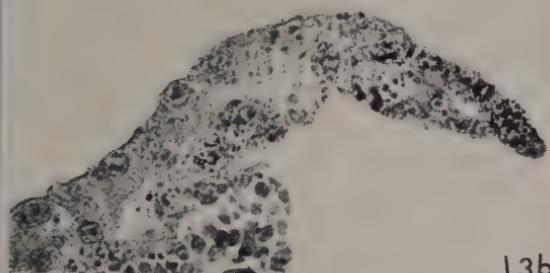
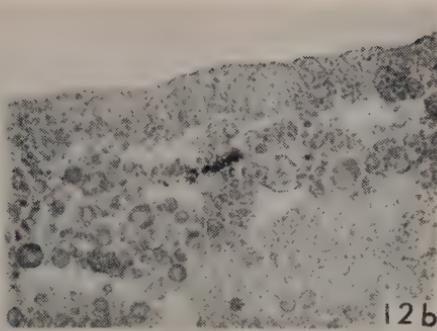
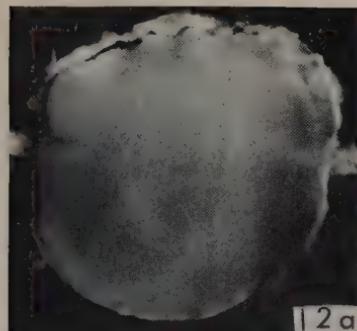
H. LUTZ

Planche 1



H. LUTZ

Planche 2



H. LUTZ

Planche 3

Anaerobiosis in the *Rana pipiens* Embryo

by ADOLPH I. COHEN¹

From the Department of Zoology, University of California, Berkeley

INTRODUCTION

BRACHET (1934, 1950) has proposed that the oxidation source for the anaerobic development of the early amphibian embryo is primarily from a pool of materials such as oxidized glutathione. Inasmuch as an investigation of the defective lactate producing ability of hybrid embryos (Barth, 1946) was contemplated, it seemed desirable to reinvestigate the problem of the source of anaerobic oxidations in this embryo. This was particularly necessary since, as will be discussed later, amphibian embryos in normal development may always be partly anaerobic and reasonable alternate interpretations of Brachet's data were possible.

Brachet's findings may be summarized briefly as showing (1) a production of carbon dioxide during anaerobiosis without diminution and indeed with some increase of tissue bicarbonates, and (2) a short burst of heightened oxygen uptake during return to oxygen with an R.Q. of about 0.3–0.5.

The low R.Q. appeared to Brachet to rule out oxidation of lactate and he attributed this to the regeneration of an oxidizable reserve that had been reduced during anaerobiosis. It is conceivable, however, that in the presence of substantial amounts of lactate the turnover of lactate to pyruvate might be so rapid as to exceed any disposal of the pyruvate to carbon dioxide or other metabolites. This pyruvate formation involves necessarily the reduction of DPN. Accordingly, a good part of the oxygen uptake might be due to the reoxidation of DPN. Since such reoxidation is believed to involve the generation of high-energy phosphate bonds as ATP (Ochoa & Stern, 1952), this reoxidation would constitute a partial payment of the so-called 'oxygen debt' incurred during the utilization of fermentative degradation of glycogen. Since this reoxidation of DPN does not involve the production of carbon dioxide, a low R.Q. is to be expected.

The gross outlines of the glycolytic system of *Rana pipiens* embryo have been described (Cohen, 1954) and lactic dehydrogenase activity is present. Accordingly the above hypothesis has a real basis and can be tested by concurrently following respiration and lactate disappearance during recovery from anaero-

¹ Author's address: Dept. of Pharmacology, Washington University Medical School, St. Louis 10, Missouri, U.S.A.

biosis. If the CO_2 required for complete oxidation of the disappearing lactate is in excess of correspondence to the appearing CO_2 , then the low R.Q. would follow of necessity, since the conversion of lactate to pyruvate is, as far as is known, the first step leading to any disposal of this material.

The question of whether the amphibian embryo, raised in air, can meet the oxygen needs of metabolism in its deeper tissues is an important one. If the deeper tissue layers are forced to utilize anaerobic metabolism to any extent, then intracellular changes will ensue which could conceivably 'trigger' cell differentiations. On the other hand, this metabolic gradient may have no effect whatsoever on differentiation. In such a case the search for 'triggers' may be directed elsewhere. The question of the extent of tissue anaerobiosis during aerobic amphibian embryo development will be discussed, particularly with reference to the observations (Heatley & Lindahl, 1937; Jaeger, 1945) of glycogen disappearance in the material invaginated during amphibian gastrulation.

MATERIAL AND METHODS

Rana pipiens eggs were obtained after pituitary injection and, after fertilization, the jelly was removed with forceps and the embryos subsequently kept under conditions designed to minimize the effects of crowding. These consisted of keeping small numbers of embryos in finger-bowls and also providing gentle aeration by means of an aquarium pump. All embryos were raised at 20° C. and experiments also performed at this temperature.

For the measurement of lactic acid the procedure of Barker & Summerson (1941) was used and the embryos handled as described in our previous paper (Cohen, 1954).

Respiration measurements and respiratory quotients were obtained by use of Warburg respirometers and, in general, the procedure of Barth (1946) was followed. Nitrogen was purified by passage over hot copper and was then washed and cooled. Embryos were rendered anaerobic by flushing the Warburg vessels containing them with nitrogen for 15 minutes. In these experiments either 15-ml. Warburg vessels (with wells and sidearms) or similar 10-ml. vessels were employed. In the larger vessels there were 90 embryos in 3 ml. of 1/10 Ringer's, in the smaller 60 embryos in 2 ml. Similarly, either 0.13 ml. or 0.08 ml. of 20 per cent. KOH was used in the well for trapping carbon dioxide, and either 0.13 ml. or 0.08 ml. of 4.8 M sulphuric acid in the sidearm was used for discharging bicarbonate.

When switching from nitrogen to air, as in the first experiments to be reported, flasks were removed from manometers and reattached after 15 minutes. In the later experiments flasks remained on the manometers and were flushed with oxygen for 2 minutes.

All stages referred to are those of Shumway (1940).

EXPERIMENTAL RESULTS

I. General picture of recovery from anaerobiosis

Embryos of late blastula or gastrula stages were exposed to anaerobic conditions for 8–12 hours and then transferred to air for 15 minutes. After reattachment of the flasks, recovery respiration was followed for 5 hours. The three-manometer method of Barth (1946) was used for measuring recovery respiration and R.Q. levels were calculated. Lactate was measured initially, at the termination of anaerobiosis (transition time), and at the end of the five recovery hours. Results are given in Table 1.

TABLE 1
Recovery from anaerobiosis

<i>Stage of embryos</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>12</i>
Recovery* lactate disappearance (micromoles/90 embryos/5 hours)	1.50	1.47	1.14	1.9
Equivalent O ₂ or CO ₂ for complete oxidation of above lactate (mm. ³)	100.1	100.8	76.8	129.9
Actual O ₂ consumed (5 hrs., mm. ³)	38.7	33.1	29.6	78.2
Actual CO ₂ evolved (5 hrs., mm. ³)	23.3	14.0	15.0	65.4
Recovery R.Q.	0.6	0.4	0.5	0.8

* 12 hours of anaerobiosis.

These results show that more lactate disappears than is accounted for by either the oxygen uptake or evolved CO₂ during the recovery period. This tends to support the hypothesis that the oxidative reserve being oxidized during recovery is the DPN reduced via pyruvate formation. The R.Q. is low, confirming Brachet's results (1934), but the levels were somewhat above his levels (*circa* 0.3). It was decided to repeat the experiment in detail with greater resolution of the changes at transition and to switch from anaerobiosis by flushing the attached flasks with oxygen for 2 minutes.

II. Detailed picture of recovery from anaerobiosis

In detail, the method involved the use of 10 groups of 60 embryos, employed as follows:

Group A gave initial bound CO₂ by tipping in acid.

Group B was used for an initial lactate level.

Groups C and D were observed for gas exchange during 7 hours of anaerobiosis. At the end of this time acid was tipped into C while D was used for a lactate determination.

Groups E and F were anaerobic for 7 hours and gas exchange noted. They were flushed with oxygen and resealed. After 20 minutes acid was tipped into E, while F was used for a lactate level.

Groups G and H were treated as were E and F, save for being sampled after 90 minutes of recovery.

Group I had an air atmosphere and KOH in its flask well. After 7 hours, during which gas exchange was noted, its flask was flushed with oxygen and resealed. Oxygen uptake was followed for 90 minutes. The embryos were then sampled for lactate.

Group J had KOH in its flask well and was anaerobic for 7 hours. Gas exchange was noted. After flushing its flask with oxygen, gas exchange was followed for 90 minutes and the embryos were then sampled for lactate.

Thus, under anaerobic conditions, the sum of the final bound CO_2 and the CO_2 evolved during the run, less the initial bound CO_2 , gives the 'new' CO_2 appearing during anaerobiosis. Under aerobic conditions, after correcting for bound CO_2 changes, CO_2 is the measured difference in gas exchange between flasks having KOH in their centre wells and those lacking this CO_2 absorbing material.

TABLE 2

Typical protocol of anaerobiosis and recovery. Stage 12 (yolk plug) embryos, 60 embryos per group

<i>Nitrogen atmosphere</i>											
Gas exchange (7 hours)	.	.	.	+35.6 mm. ³							1.63 μmoles
Transition bound CO_2	.	.	.	+17.1							
Less initial bound CO_2	.	.	.	+52.7 36.8							
'New' CO_2	.	.	.	+15.9							
<i>Nitrogen to oxygen</i>											
20 min. bound CO_2	.	.	.	+19.2							
'New' bound CO_2	.	.	.	+2.1							
20 min. $\text{O}_2 + \text{CO}_2$.	.	.	-10.9							
Less 20 min. O_2	.	.	.	-15.4							
20 min. CO_2	.	.	.	+6.6							
20 min. R.Q.	.	.	.	0.4							
90 min. bound CO_2	.	.	.	+17.1							
'New' bound CO_2	.	.	.	0.0							
90 min. $\text{O}_2 + \text{CO}_2$.	.	.	-19.5							
Less 90 min. O_2	.	.	.	-29.4							
90 min. CO_2	.	.	.	+9.9							
90 min. R.Q.	.	.	.	0.5							
<i>Air Atmosphere</i>											
O_2 uptake (7 hours)	.	.	.	-66.7							
<i>Air to oxygen</i>											
20 min. O_2	.	.	.	-13.6							
90 min. O_2	.	.	.	-30.6							
Lactate present	.	.	.								
Less initial lactate	.	.	.								
'New' lactate	.	.	.								
20 min. lactate	.	.	.								
Less initial lactate	.	.	.								
Lactate loss	.	.	.								
90 min. lactate	.	.	.								
90 min. lactate	.	.	.								

Table 2 shows the detailed results for one of four experiments giving essentially similar results. Many individual features of these experiments were confirmed in numerous pilot experiments. Table 3 shows the data for the oxygen

uptake on transfer from either air or nitrogen to an oxygen atmosphere. It is evident that there is indeed a burst of oxygen uptake on transfer and also that there is no significant difference between embryos going from air or nitrogen to oxygen.

TABLE 3

Respiratory response of gastrulae placed in oxygen

Expt.	20 minutes		90 minutes	
	Air-O ₂	N ₂ -O ₂	Air-O ₂	N ₂ -O ₂
A	-13.1 mm. ³	-13.8 mm. ³	-24.2 mm. ³	-21.8 mm. ³
B	-11.3	-10.5	-21.2	-18.5
C	-13.6	-15.4	-30.6	-29.4
D	-16.5	-16.9	-25.0	-26.3

If the burst of oxygen uptake were due to complete oxidation of lactate, the R.Q. should have been about 1.0, but, in confirmation of Brachet (1934), it is about 0.3. An hypothesis of partial oxidation would find the data for the embryos going from nitrogen to oxygen consistent, but would fail to explain an uptake burst of similar magnitude for embryos going from air to oxygen. The R.Q. tends to rise after the burst, but, as Table 1 showed, was still low (normal = 0.87) for some time. Again in confirmation of Brachet is the finding of some CO₂ produced during anaerobiosis but not attributable to bicarbonate discharge. The level of this 'new' CO₂ roughly corresponds to the level of excess oxygen uptake during the burst. This tends to confirm Brachet's conjecture that an oxidizable reserve exists. Moreover, 0.7 of a micromole of 'new' CO₂ reflects an oxidizing potential equal to 2.1 micromoles of lactate and Table 2 shows but 1.6 micromoles of this material. Accordingly this reflects a source of anaerobic oxidations at least equal to lactate production. The fact that the burst on going from air to oxygen is equal in magnitude to that on going from nitrogen to oxygen, suggests that this is a more immediate source of oxidations than lactate production. It is also possible that fermentation involves the cleavage of sugar to lactate, CO₂, and some other fragment, but inasmuch as examples of such heterolactic fermentation are thus far limited to micro-organisms, this hypothesis to explain 'new' CO₂ should await elimination of more conventional hypotheses.

DISCUSSION

Since a burst of oxygen uptake occurs on transferring embryos from air to oxygen, it follows that after the material responsible for this burst is in the reduced state, it can no longer serve as a source of anaerobic oxidations. It will be necessary to precisely locate the time when this reduction takes place for embryos raised in air. Lactate production, of course, still remains a substantial means of anaerobic oxidations and, as Table 1 shows, the payment of the oxygen

debt for lactate is a gradual process, the extent of which will depend on the embryo's energy needs and the efficiency of DPN reoxidations. The rapid disappearance of lactate during recovery from anaerobiosis, however, permits the expectation of a low R.Q. during this process.

Frog embryos, on crowding, accumulate lactic acid. This suggests that the embryos are normally close to partial anaerobiosis. Moreover, glycogen loss first becomes apparent during gastrulation (Brachet & Needham, 1935; Gregg, 1948) and, in fact, disappears from the material being invaginated (Jaeger, 1945). It is of interest, therefore, to consider whether such loss indicates that the metabolism of the invaginated material is oxygen limited.

In the absence of a circulatory system, the oxygen supply to the forming embryonic tissues of the gastrula is dependent on diffusion. Estimation of whether diffusion could supply oxygen to the invaginated material is quite difficult inasmuch as (1) the tissue is not homogenous, and (2) the respiration is not uniform, (3) the oxygen concentration at the gastrula surface will be changing if the medium is static or unchanging if the medium is in motion, and (4) the rate of diffusion of oxygen through the tissue is unknown.

It is possible to show by a few considerations of size that, at the very least, the dimensions of a frog gastrula must place the embryo on the borderline of anaerobiosis at the usual temperatures employed in physiological experiments on amphibian embryos (*circa* 18–20° C.). In the following discussion we will assume a uniform respiration of 0·162 microlitres per mg. per hour (Sze, 1953) or $2\cdot7 \times 10^{-3}$ ml. per g. per minute. We shall also assume as the diffusion constant the figure which Krogh (1941) gives for 15 per cent. gelatin at 20° C., $2\cdot8 \times 10^{-5}$ ml. per minute (through a volume of 1 ml. at 1 atmosphere). For comparison, water is $3\cdot4 \times 10^{-5}$ and muscle $1\cdot4 \times 10^{-5}$ ml. per minute.

If we now make the assumption that the gastrula is a sphere of 0·25 cm. in diameter and of uniform composition, then the external oxygen concentration necessary for the sphere centre to have a zero concentration is given by the equation of Harvey (1928). The sphere radius is R , the respiration A , and the diffusion constant D .

$$C_0 = \frac{AR^2}{6D} = \frac{2\cdot7 \times 10^{-3} \times 0\cdot0156}{2\cdot8 \times 10^{-5} \times 6} = 0\cdot26 \text{ atmospheres.}$$

This value, of course, exceeds the concentration of oxygen in air.

Another approach involves the use of Warburg's equation for calculating the maximum thickness that a tissue slice may have if diffusion of oxygen is not to limit respiration (in Umbreit *et al.*, 1949). Since a tissue slice receives oxygen from two surfaces while the tissue comprising the archenteron roof to the embryo surface receives oxygen from one surface only, the latter must be compared to a tissue slice of twice its thickness. Thus, if a fair estimate of the supra-archenteron material is 0·05 cm., it must be compared to a tissue slice of 0·1 cm. thickness.

In the Warburg equation

$$d = (8C_0D/A)^{\frac{1}{2}},$$

where d is the limiting thickness, D the diffusion constant for oxygen in ml. per minute, A the respiration in ml. per gramme per minute, and C_0 the external oxygen concentration in atmospheres. Substituting,

$$d = \left(\frac{8 \times 2.8 \times 10^{-5} \times 0.2}{2.7 \times 10^{-3}} \right)^{\frac{1}{2}} = 0.044 \text{ cm.}$$

Thus the calculated critical thickness is less than the actual.

Since the Harvey equation is, in fact, a modified version of the Warburg equation, the same assumptions of diffusion theory are involved. A reader of this paper has called our attention to a more modern approach by Linderstrøm-Lang (1947). The latter's equation (17) considers the ratio of oxygen concentration at the centre of a sphere to outside concentration. Since respiration is herein treated as a function of volume rather than mass, for a 1.3-mg. dry-weight gastrula of radius 0.125 cm. the respiration at 20° C. would be 21×10^{-5} cm.³ per hour. Substituting gives a ratio of 0.66. This would hardly seem limiting. The disparity between these approaches is obvious, but Linderstrøm-Lang does not state specifically why his approach yields more accurate results or even different results. If he is correct, then either the embryo is not anaerobic or it is so for reasons other than size. If the Warburg type of approach is valid, then the dimensions of a gastrula (developing at 20° C.) are sufficient to make the oxygen supply critical.

By assuming that glycogen utilization would either be expressed as oxygen uptake or lactate production and that the R.Q. of the gastrula was 1.0, we were able to show (Cohen, 1954) that no combination of oxygen uptake or accumulating lactate can account for the amounts of glycogen reported to disappear during gastrulation (Jaeger, 1945). This seemed to suggest that glycogen utilization was not associated with either an increased energy demand or a less efficient use and accordingly greater consumption of glycogen by anaerobic tissue. Since CO₂ production does not exceed the O₂ uptake at this time (i.e. the R.Q. is less than 1.0), the participation of an oxidizable reserve in the oxidation of the glycogen would not appear to alter these interpretations. Recently Gregg & Ornstein (1953) attempted to find glycogen loss in explanted chorda-mesoderm kept for 24 hours under anaerobic conditions (during which time controls went through gastrulation), but failed to do so. From the same authors earlier (Ornstein & Gregg, 1952), data on anaerobic CO₂ evolution (25° C., 24 hours) from explants, one might expect a loss of 7–8 per cent. of the glycogen of the explants. The data seem to support the concept that glycogen does not disappear simply because the invaginated tissue is anaerobic. These anaerobic glycogen loss experiments, however, were performed at a lower temperature.

Since cell differentiations may be 'triggered' by environmental gradients, the

above considerations are of importance to embryologists. There is clearly substantial evidence for regarding oxygen as being limiting for some portions of amphibian gastrulae.

SUMMARY

1. Evidence is presented demonstrating that although a short burst of oxygen uptake follows transfer of *Rana pipiens* embryos from a nitrogen to an oxygen atmosphere, a similar burst follows transfer from air to oxygen. Since the material being oxidized exists in the reduced state in gastrulae raised in air, it cannot constitute a major source of anaerobic oxidations in gastrulae. Data and considerations suggesting that the amphibian embryo is normally partially anaerobic in the usual temperature range employed in physiological experiments are presented.

2. A detailed description of the respiratory and lactate level changes of embryos transferred to an oxygen atmosphere after anaerobiosis is given and the significance of the findings is discussed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This constitutes a portion of work done under the tenure of a National Science Foundation (U.S.A.) postdoctoral Fellowship. The author wishes to express his appreciation to Professors Daniel Mazia and Howard Bern for placing much of their laboratory facilities at his disposal.

REFERENCES

- BARKER, S. B., & SUMMERSON, W. H. (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological materials. *J. biol. Chem.* **138**, 535-54.
- BARTH, L. G. (1946). Studies on the metabolism of development. *J. exp. Zool.* **103**, 463-86.
- BRACHET, J. (1934). Etude du métabolisme de l'œuf de Grenouille (*Rana fusca*) au cours du développement. I. La respiration et la glycolyse, de la segmentation à l'éclosion. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **45**, 611-727.
- (1950). *Chemical Embryology*, pp. 262-9, 329-44. Trans. L. G. Barth. New York: Interscience Publishers.
- & NEEDHAM, J. (1935). Etude du métabolisme de l'œuf de Grenouille (*Rana fusca*) au cours du développement. 4. La teneur en glycogène de l'œuf de la segmentation à l'éclosion. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **46**, 821-35.
- COHEN, A. I. (1954). Studies on glycolysis in the early *Rana pipiens* embryo. *Physiol. Zool.* **27**, 128-41.
- GREGG, J. R. (1948). Carbohydrate metabolism of normal and hybrid amphibian embryos. *J. exp. Zool.* **109**, 119-34.
- & ORNSTEIN, N. (1953). Explant systems and the reactions of gastrulating amphibians to metabolic poisons. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **105**, 466-76.
- HARVEY, E. N. (1928). The oxygen consumption of luminous bacteria. *J. gen. Physiol.* **11**, 469-75.
- HEATLEY, N. G., & LINDAHL, E. (1937). Studies on the nature of the amphibian organization centre. V. The distribution and nature of glycogen in the amphibian embryo. *Proc. roy. Soc. B*, **122**, 395-402.
- JAEGER, L. (1945). Glycogen utilization by the amphibian gastrula in relation to invagination and induction. *J. cell. comp. Physiol.* **25**, 97-120.

KROGH, A. (1941). *The Comparative Physiology of Respiratory Mechanisms*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press.

LINDERSTRØM-LANG, K. (1947). Periodic metabolism and diffusion. *C.R. Lab. Carlsberg*, **25** (Physiol.), 229–71.

OCHOA, S., & STERN, J. R. (1952). Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **21**, 547–602.

ORNSTEIN, N., & GREGG, J. R. (1952). Respiratory metabolism of amphibian gastrula explants. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **103**, 407–20.

SHUMWAY, W. (1940). Stages in the normal development of *Rana pipiens*. *Anat. Rec.* **78**, 139–47.

SZE, L. C. (1953). Respiration of the parts of the *Rana pipiens* gastrula. *Physiol. Zool.* **26**, 212–23.

UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., & STAUFFER, J. F. (1949). *Manometric techniques and tissue metabolism*. Minneapolis: Burgess Publishing Company.

(*Manuscript received 18:vi:54*)

Interactions between Ovary and Lateral Oviduct in *Drosophila melanogaster*

by E. M. PANTELOURIS¹

From the Institute of Animal Genetics, Edinburgh

INTRODUCTION

IN *Drosophila* the genital ducts arise from the so-called genital imaginal disk which in the larva lies at some distance from the gonads. In the male, interactions between these two components of the reproductive system are well known. The study of gynandromorphs of *Drosophila simulans* led Dobzhansky (1931) to suggest that the spiral form which the testes normally assume in the adult of these animals is only produced when the gonad makes contact with the genital duct. Stern (1941 *a* and *b*) investigated the matter by transplanting the testes and amply confirmed Dobzhansky's suggestion, finding that the genital duct induces the testes to grow into a form which, surprisingly enough, is characteristic of the inducer and not of the reacting material. Further, Stern & Hadorn (1939) have revealed a reciprocal reaction by which the testis affects a duct to which it is attached in so far as it supplies to the latter pigmented cells which clothe it in a coloured epithelium. Hadorn & Bertani (1948) have shown that similar cells can pass on to the duct from an attached ovary and then form typical male pigment. We have, however, rather little information about interactions between the gonads and ducts in the female, although Hadorn & Gloor (1946) have shortly recorded the results of an investigation into the properties of the various parts of the female genital disk.

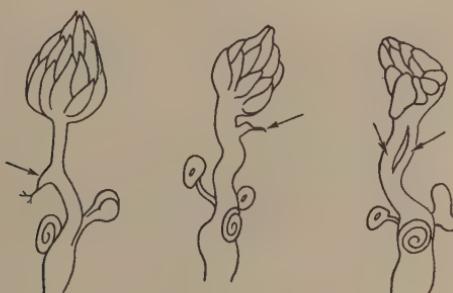
The aim of the present investigation was to detect any interactions there may be between the gonads and the genital ducts in the female, using the methods of extirpation of the ovaries or transplantation of ovaries or disks. All the experiments were carried out on late third instar larvae of various laboratory stocks of *Drosophila melanogaster*. The transplantations were made by the usual method of Ephrussi & Beadle (1935). Ovaries were extirpated by making a small incision at the sixth abdominal segment with a fine pair of forceps, pulling out part of the fat body containing the ovary and cutting it off. It is difficult but possible to remove the ovaries on both sides, but the percentage of survival following such a drastic operation is very small. The same technique has been applied for the removal of testes.

¹ Author's address: Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh 9, U.K.

EXPERIMENTAL RESULTS

1. Removal of one ovary

Eleven out of forty-four operated larvae reached the adult stage and were dissected about 2 days after hatching. The diagrams of Text-fig. 1 show the arrangement of ducts and ovary found. It will be noted that no lateral oviduct



TEXT-FIG. 1. Arrangement of adult oviducts and the remaining ovary following removal of the other ovary at the third instar stage. In the first two diagrams the arrows point to the rudiment of the lateral oviduct on the operated side. In the third the two arrows point to the two lateral oviducts which have, in a few cases, both grown and joined the single ovary.

develops on the side on which there is no ovary left, although a rudiment of the lateral oviduct is clearly present. The uterus, oviduct, and the single lateral oviduct form a more or less straight tube. In two exceptional cases, in which both lateral oviducts developed, they were both joined to the single remaining ovary.

The conclusion was tentatively drawn that the presence of the ovary is a necessary factor for the growth of the lateral oviduct. The evidence was further strengthened by the following experiment.

2. Removal of both ovaries

Only two out of a small series of larvae, both ovaries of which were removed, hatched as imagos. Both lateral oviducts failed to develop. The rest of the genital duct system was normal.

3. Implantation of a supernumerary ovary into female larvae

Large numbers of larvae were thus operated and several stocks were used. The results showed that an additional ovary cannot cause the growth of an additional lateral oviduct, and either remains unattached or shares a lateral oviduct with one of the host's own ovaries. In some cases the implant forms a compound ovary with one of the host's gonads. In others it remains distinct and connects to the lateral oviduct directly. In two cases one lateral oviduct was

found to be considerably longer than the other and joined to a compound of two ovaries. Presumably, as a result of the operation, the two ovaries on the operated side were displaced and the lateral oviduct grew out to them. This is a further confirmation of the reality of the influence of the ovary on the development of



TEXT-FIG. 2. Arrangement of adult oviducts and ovaries in cases where an additional implanted ovary has established connexion with the oviducts.

the lateral oviduct. The arrangements obtained are shown diagrammatically in Text-fig. 2 and their incidence in a typical series were as follows:

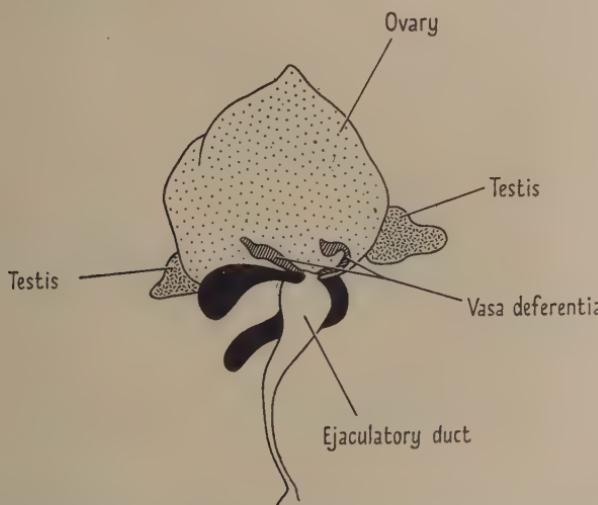
Compound ovary on one side	7
Three ovaries 'in series'	6
Unequal oviducts, larger on side of the compound ovary	2
	—
Total 15	

In the above list only the cases where the implanted ovary achieved attachment are included. In about one-fourth of the hatching imagoes, however, the implanted ovary was either not found or was unattached and smaller than the attached ones. Also, where all three ovaries were attached, not all were of the same size, usually the two on the same side remaining smaller than the other and also unequal among themselves. It seemed doubtful, however, whether attachment to the oviduct is necessary to the ovary's growth, and the small size of the implant in many cases could be attributed either to damage during the operation or to competition. That the presence of the lateral oviduct is not necessary for ovary growth was confirmed by the results obtained by the following transplantation experiment.

4. Transfer of an ovary into a male larva

In most out of twelve operated males which hatched, the ovary was found in the abdomen, with differentiated egg strings but of small size. In one case, however, the ovary had become attached to the male duct, excluding the testes from it, and had grown to full size as shown in Text-fig. 3. The testes remained rudimentary and uncoiled, but the accessory glands were normal. In section sperm

bands were seen in the testes, and the sheath of the accessory glands or 'paragonia' showed the typical binucleate cells. In another specimen too the implanted ovary had grown to normal size, but was not connected with the ducts. The testes were normal in size, but their coiling was atypical.



TEXT-FIG. 3. Internal genitalia of a male with an implanted ovary which has established connexion with the ejaculatory duct.

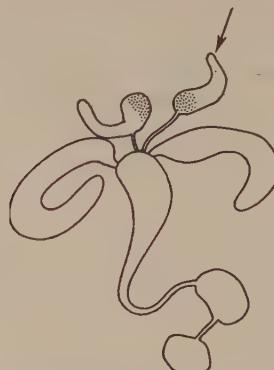
5. Removal of one testis

It appeared possible that, although as Stern showed the vas deferens regulates testis growth after it establishes connexion with it, the testis might, as the ovary proved to be doing in the female, exert an effect on the growth of the vas deferens so that it reaches the testis. By removing one of the testes it was found that the vasa deferentia had grown normally on both sides, and actually that the one on the operated side ended in a thin filamentous structure. In several cases the remaining testis showed atypical coiling or reduced growth. In one case the accessory gland was also missing on the operated side.

It appeared then that the testis exerts no influence on the growth of the vas deferens. It could still be the case, however, that such an influence is necessary, and that in this experiment it was exerted on both vasa by the remaining testis. The removal of both testes was therefore attempted.

6. Removal of both testes

It proved difficult to achieve a reasonable survival rate in this experiment and only one adult hatched. Both vasa deferentia were normal, although there was no testis present (Text-fig. 4). The filamentous structures at the end of both vasa were large, and in fact appeared to be tubular.



TEXT-FIG. 4. Duct system in a male, both testes of which were removed at the third-instar stage. The arrow points to the tubular outgrowth from the seminal vesicle.

7. Transplantation of male genital disks

Since only one specimen was obtained in the previous experiment, it was attempted to obtain more genital ducts developing without attached testes by transplanting male genital disks into male host larvae. A small series of such operations was performed and four hatching imagos were obtained. In three of them the implant had given rise to a complete system of genital ducts and (inverted) external genital plates. Again the vasa deferentia¹ were present and ended in a filament. In the fourth specimen the segment carrying the host's external genitalia was abnormally elongated. On dissection, one of the host's accessory glands was found to be reduced in size and the testis on that same side was rudimentary. The implant was also poorly developed; the genital duct was not dilated at the distal end and there were no vasa deferentia or accessory glands.

This experiment confirmed the conclusion that the vasa deferentia develop independently of the testes.

DISCUSSION

The evidence shows that the ovary exerts an influence governing the growth of the lateral oviduct on the corresponding side. If a similar influence on the other side is missing, the remaining ovary may affect both lateral oviducts. It does not appear that the lateral oviduct exerts an influence on the growth of the ovaries. The size of any supernumerary ovary, experimentally introduced, is decided by competition. It seems likely that if the implant comes from a different stock, genetic factors might favour the ovary or ovaries of one genotype compared with the other.

¹ This part, which connects by a fine 'testicular duct' with the testis, is termed vas deferens by some but vas efferens by others, who reserve the name vas deferens for the ejaculatory duct.

These phenomena contrast with those in the case of the male, where (a) the testis does not influence the growth of the vasa deferentia, and (b) once connexion between these structures is established, the vas governs the growth of the testis. Stern attributed this effect to a substance produced by the vas and diffusing to the attached testis. In this connexion too there is a difference in the case of the female. If one assumes that the influence of the ovary is exerted via a diffusible substance, this must be reaching the duct without a direct attachment between the two structures.

SUMMARY

Experimental evidence is produced to show that during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*:

1. The growth of the lateral oviducts depends on an influence of the ovaries.
2. The growth of the ovaries does not depend on a reciprocal influence.
3. The growth of the vasa deferentia is independent of any influence from the testis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is indebted to Professor C. H. Waddington for his interest and suggestions during the course of this work, and to the Melville Trust for a Research Fellowship.

REFERENCES

DOBZHANSKY, T. (1931). Interactions between female and male parts in gynandromorphs of *Drosophila simulans*. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **123**, 719-46.
EPHRUSSI, B., & BEADLE, G. W. (1935). La transplantation des ovaires chez la Drosophile. *Bull. biol.* **69**, 492-502.
HADORN, E., & BERTANI, G. (1948). Induktion männlicher Pigmentierung in somatischen Zellen von Drosophila-Ovarien. *Rev. suisse Zool.* **55**, 232-43.
— & GLOOR, H. (1946). Transplantationen zur Bestimmung des Anlagemusters in der weiblichen Genital-Imaginalscheibe von *Drosophila*. *Rev. suisse Zool.* **53**, 495-501.
STERN, C. (1941a). The growth of testes in *Drosophila*. I. The relation between vas deferens and testis within various species. *J. exp. Zool.* **87**, 113-58.
— (1941b). The growth of testes in *Drosophila*. II. The nature of interspecific differences. *J. exp. Zool.* **87**, 159-80.
— & HADORN, E. (1939). The relation between the color of testes and vasa efferentia in *Drosophila*. *Genetics*, **24**, 162-79.

(Manuscript received 19 : viii : 54)

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

Contributions and correspondence about them should be sent to Mr. M. Abercrombie, Department of Anatomy and Embryology, University College, Gower Street, London, W.C.1, England.

Contributions should be as concise as possible. They should be typewritten, double-spaced, on one side of the paper, the pages numbered. They should be fully ready for press, since revision in proof will not be possible. Footnotes should be avoided. The author is advised to keep a copy of the typescript.

Tables should be on separate sheets, and numbered. Authors should indicate the places for their insertion in the margin of the typescript. The Summary should be in numbered paragraphs, and will be put at the end of the text. It should not exceed 500 words.

Acknowledgements should be placed immediately before the list of references.

References should be listed alphabetically. In the text they should be referred to by the author's name and the year of publication. If more than one reference to the same author and year is quoted, use suffixes *a*, *b*, &c. (e.g. 1951*a*) in text and reference list. Papers should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title of paper; name of journal (World List of Scientific Periodicals abbreviation), underlined; volume number; first and last page: e.g. Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. mikr. Anat.* **100**, 599–683. Books should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title underlined; place of publication; publisher: e.g. Dalcq, A. (1941). *L'Œuf et son dynamisme organisateur*. Paris: Albin Michel.

Illustrations. Line drawings should be used wherever possible, in preference to illustrations requiring half-tone reproduction. In general, their size should be such that they are reduced for publication to approximately two-thirds linearly. When reduced, no illustration together with its lettering should exceed five inches in width, and, if it is to occupy a whole page, seven and a half inches in length. Name of author and figure number should be written on

the back, together with the proposed reduction in size. Magnification should be indicated by a scale-line drawn in Indian ink on or beside all drawings and photographs.

Black and white line or line and dot drawings should have all lettering or numerals put in lightly in block capitals with a soft pencil. Charts and graphs may be drawn in Indian ink on graph paper ruled in pale blue. Where several drawings are grouped as one figure, distinguish them by capital letters (in pencil). Legends for all line drawings should be typed together on a separate sheet. The places for insertion in the text should be indicated in the margin of the typescript. The drawings should be referred to in the text as 'Text-fig. 1', &c.

Half-tone illustrations (photographs or drawings other than black and white) will be limited in number; authors may be asked to provide a grant for an excessive number. If fine detail is not required they can be reproduced amongst the text (please indicate position), in which case they should be numbered in series with the line drawings, if any. If fine detail is required, they will be on a separate plate. The legends should then be typed on a separate sheet, headed 'Explanation of Plate(s)', and the illustrations should be referred to in the text as 'Plate 1, fig. A', &c. Leader lines should be drawn in Indian ink. All letters or numerals which are to go on the illustration, should be in pencil (block capitals) on a covering sheet of transparent paper. Lettering or numerals to go at the side should be written there in pencil (block capitals); photographs, for this purpose, should be mounted on card. If the author wishes the block-maker to pay special attention to reproducing any part of an illustration, he should indicate this on the transparent paper. Photographs should be glossy bromide prints.

Proofs. Authors will receive one set of proofs for correction and return to the Editor. Authors may be required to pay for an excessive number of alterations in proof, apart from printer's errors.

Reprints. Authors will receive fifty free reprints. Additional copies may be ordered for purchase when proofs are returned to the Editor.

Journal of
Embryology and Experimental Morphology

[J. Embryol. exp. Morph.]

VOLUME 3

March 1955

PART 1

Contents

GIROUD, A., LEFEBVRES, J., PROST, H., <i>et DUPUIS, R.</i> Malformations des membres dues à des lésions vasculaires chez le fœtus de rat déficient en acide pantothénique <i>Avec 3 planches</i>	1
FRAZER, J. F. D. Foetal Death in the Rat	13
MASY, SIMONE Le système nerveux périphérique crânien de l'embryon humain de 9 mm. <i>Avec 2 planches</i>	30
FELDMAN, M., <i>and WADDINGTON, C. H.</i> The Uptake of Methionine-S ³⁵ by the Chick Embryo and its Inhibition by Ethionine <i>With 1 plate</i>	44
LUTZ, HUBERT Contribution expérimentale à l'étude de la formation de l'endothroblast chez les Oiseaux <i>Avec 3 planches</i>	59
COHEN, ADOLPH I. Anaerobiosis in the <i>Rana pipiens</i> Embryo	77
PANTELOURIS, E. M. Interactions between Ovary and Lateral Oviduct in <i>Drosophila melanogaster</i>	86